



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA RUTA DE TGF- β EN
LA ARTROSIS**

Manuel Enrique Pombo Suárez

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA RUTA DE TGF- β EN
LA ARTROSIS**

Firmado:.....

Manuel Enrique Pombo Suárez

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACULTAD DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Dr. Antonio González Martínez-Pedrayo, investigador principal del Laboratorio de Investigación 10 del Instituto de Investigación Sanitaria del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

Dr. Antonio Mera Varela, profesor del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

Como Directores de la Tesis titulada “Análisis de la ruta de TGF- β en la artrosis”

Presentada por D. Manuel Enrique Pombo Suárez

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma, no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Dr. Antonio González Martínez-Pedrayo

Dr. Antonio Mera Varela



Detrás de toda verdad casi siempre hay una probabilidad.





AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas pretendo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, familia, amigos y compañeros, y que, directa o indirectamente, han hecho posible que este proyecto se llevara a cabo.

A mi director de Tesis, el Dr. Antonio González, por haber confiado en mí y ofrecerme su apoyo y ayuda en todas las etapas de la elaboración de esta Tesis. Por sus consejos, tiempo dedicado y por tener siempre la puerta abierta para resolver dudas. Gracias por tu perseverancia y rigor a la hora de dirigir este trabajo.

Gracias también al Dr. Antonio Mera, por estar siempre dispuesto a ayudar cuando se necesita y por su implicación en la meticulosa evaluación de este proyecto.

Al Prof. Gómez-Reino, por haberme acogido en el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y por apoyarme en todo lo que hago.

A la Prof. María Teresa Castaño, por su inestimable ayuda con la inmunohistoquímica, por su predisposición para ayudar en todo lo necesario y por transmitir una enorme ilusión en el trabajo.

Durante todos los años que estuve en el laboratorio tuve la fortuna de hacer grandes amigos, gente que aunque pase el tiempo sin vernos, cuando nos reencontramos es como si el tiempo no hubiera pasado. Gracias a todos ellos.

Quisiera hacer una mención especial a Manolo, siempre estaré en deuda contigo por todo lo que me has ayudado.

Gracias a Laura por su ayuda con la realización de los Western.

Gracias a Miguel por su asistencia en la edición de este trabajo.

Gracias a Paula y a Diego por haberme apoyado en la realización de este proyecto, sin vosotros no lo podría haber hecho.

A mi familia por estar siempre ahí, a quiénes debo el camino recorrido hasta el momento, por darme todo sin esperar nada a cambio.

Por último, gracias a Vanesa, por su apoyo incondicional y por su paciencia. Gracias por compartir tu vida conmigo.

A todos ellos, mi más sinceras gracias.



RESUMEN



RESUMEN

La artrosis es una de las principales causas de discapacidad crónica. Su etiopatogenia no está definida. El conocimiento actual indica que las lesiones artrósicas son la consecuencia del fracaso de la respuesta anabólica para hacer frente al incremento en el daño y degradación del cartílago. Muchos estudios han demostrado que el TGF- β es un potente inductor de la respuesta anabólica y antagonista del catabolismo del cartílago. Por lo tanto, se considera que TGF- β desempeña un papel fundamental en el cartílago artrósico. El objetivo del presente trabajo es obtener una colección de muestras de cartílago humano para determinar los niveles de expresión de diferentes moléculas implicadas en la ruta de TGF- β , tratando de evidenciar cambios en la expresión de dichas moléculas, lo que podría explicar su implicación en la etiopatogenia de la artrosis.

PALABRAS CLAVE

Artrosis, etiopatogenia, TGF- β

RESUMO

A artrose é unha das principais causas de discapacidade crónica. A súa etiopatoxenia non está definida. O coñecemento actual indica que as lesións artrósicas son a consecuencia do fracaso da resposta anabólica para facer fronte ó incremento no dano e degradación do cartílagos. Moitos estudos demostraron que o TGF- β é un potente inductor da resposta anabólica e un antagonista do catabolismo do cartílagos. Polo tanto, considérase que TGF- β xoga un papel fundamental no cartílagos artrósico. O obxectivo do presente traballo é obter unha colección de mostras de cartílagos humano para determinar os niveis de expresión de diferentes moléculas implicadas na ruta de TGF- β , tratando de evidenciar cambios na expresión de ditas moléculas, o que podería explicar a súa implicación na etiopatoxenia da artrose.

PALABRAS CHAVE

Artrosis, etiopatogenia, TGF- β

SUMMARY

Osteoarthritis is a major cause of chronic disability. Its pathogenesis is not defined. Current knowledge indicates that osteoarthritic injuries are the result of the failure of the anabolic response to cope with the increase in damage and cartilage degradation. Many studies have shown that TGF- β is a potent inducer of the anabolic response and a cartilage catabolism antagonist. Therefore, it is considered that TGF- β plays a fundamental role in osteoarthritic cartilage. The aim of this study is to obtain a collection of samples of human cartilage to determine the expression levels of different molecules involved in the pathway of TGF- β , trying to detect changes in the expression of these molecules, which could explain their involvement in the pathogenesis of osteoarthritis.

KEYWORDS

Osteoarthritis, etiopathogenesis, TGF- β





ÍNDICE



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	21
1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 Resumen	29
1.2 Artrosis.....	30
1.3 Cartílago.....	34
1.3.1 Cartílago y OA.....	36
1.4 Tejido sinovial.....	38
1.5 Osteofitos	39
1.6 TGF- β	40
1.6.1 TGF- β y cartílago.....	46
1.6.2 TGF- β y OA	47
1.6.2.1 Efecto protector.....	47
1.6.2.2 Efecto deletéreo	48
1.7 Estudios de expresión en cartílago humano	50
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 Objetivo general	57
2.2 Objetivos específicos	57
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1 Obtención de muestras de cartílago.....	61
3.1.1 Estudio de genes de referencia.....	61
3.1.2 Estudio de la ruta de TGF- β	63
3.2 Disección de cartílago y evaluación	64
3.3 Extracciones de ARN	67
3.4 Transcripción inversa y PCR cuantitativa	67

3.5 Análisis de las qPCR	70
3.5.1 Eficiencias de las PCR y determinación del ciclo umbral	70
3.5.2 Análisis de los datos.....	71
3.5.2.1 Estudio de los genes de referencia	71
3.5.2.2 Estudio de la ruta de TGF- β	72
3.6 Inmunohistoquímica	73
3.7 Extracción de proteínas y Western-blot.....	75
4 RESULTADOS	79
4.1 Estudio de genes de referencia	81
4.2 Estudio de la ruta de TGF- β	88
4.2.1 Estudio de las isoformas de TGF- β	88
4.2.2 Estudio de SMAD2, SMAD3 y PPM1A.....	95
4.2.3 Estudio de ALK1, ALK5 y TGFBR2	100
5 DISCUSIÓN.....	103
5.1 Estudio de genes de referencia	106
5.2 Estudio de la ruta de TGF- β	112
5.2.1 Estudio de las isoformas de TGF- β	112
5.2.2 Estudio de SMAD2, SMAD3 y PPM1A.....	120
5.2.3 Estudio de ALK1, ALK5 y TGFBR2	125
6 CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA.....	133
ANEXO	165



ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

- 18S rRNA:** 18S ARN ribosomal.
- ACG1:** agrecano.
- ACTB:** actina beta.
- ALK:** quinasa tipo receptor de activina (*activin receptor like kinase*).
- ARN:** ácido ribonucleico.
- B2M:** beta 2 microglobulina.
- BMPs:** proteínas morfogenéticas óseas (*bone morphogenetic proteins*).
- Ct:** ciclo umbral (*cycle threshold*).
- COL2A1:** colágeno tipo II alfa 1.
- ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular-signal regulated kinases*).
- GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).
- HMBS:** hidroximetilbilano sintasa.
- IL:** interleuquina.
- JAK:** janus quinasas (*Janus Kinase*).
- JNK:** quinasas c-JUN N-terminal (*c-JUN N-terminal Kinases*).
- LAP:** péptido asociado de latencia (*latency associated peptide*).

- MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen activated protein kinase*).
- ECM:** matriz extracelular (*extracellular matrix*).
- HPRT1:** hipoxantina fosforibosiltransferasa (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*).
- IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*insulin-like growth factor 1*).
- MMPs:** metaloproteinasas de matriz extracelular (*matrix metalloproteinases*).
- NO:** óxido nítrico (*nitric oxide*).
- OA:** artrosis (*osteoarthritis*).
- PCR:** reacción en cadena de polimerasa (*polymerase chain reaction*).
- PPM1A:** proteína fosfatasa 1A (*protein phosphatase 1A*).
- qPCR:** reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*).
- R:** receptor.
- RPL13A:** proteína ribosomal L13A (*ribosomal protein L13A*).
- RT:** transcripción inversa (*reverse transcription*).
- SDHA:** complejo succinato deshidrogenasa (*succinate dehydrogenase complex*).

- SLRPs:** proteoglicanos de pequeño tamaño ricos en leucina (*small leucine-rich repeat proteoglycan*).
- SMADs:** homólogas de la proteína de *Drosophila* (*mothers against decapentaplegic*, MAD) y la proteína de *C. elegans* SMA (*small body size*).
- TBP:** proteína de unión a TATA (*TATA box binding protein*).
- TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*).
- TIMPs:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (*tissue inhibitors of metalloproteinases*).
- TNFα:** factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*).
- UBC:** ubiquitina C.





1 INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.1 Resumen

La artrosis (OA) (OMIM 165720) es una enfermedad multifactorial que afecta a diferentes tejidos que forman parte de la articulación. La destrucción del cartílago es uno de los mayores problemas que se produce en la OA y el cartílago es el principal objetivo del enfoque terapéutico. Se han propuesto diferentes factores de crecimiento como candidatos que podrían estimular a los condrocitos para reparar la matriz extracelular (ECM) dañada. En concreto, se ha identificado un factor de crecimiento con un gran potencial para la reparación del cartílago, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Sin embargo, todavía hay muchas incógnitas sobre su papel en la OA y este trabajo se centra en contribuir a clarificar el papel que TGF- β desempeña en la OA.

1.2 Artrosis

La OA es la enfermedad articular más prevalente y conlleva una elevada morbilidad, con la consiguiente gran carga económica que ello acarrea [1]. Las perspectivas actuales son que esta problemática se vea agravada debido al envejecimiento de la población y al incremento en la prevalencia de la obesidad [2].

Todavía se desconoce la etiología de la OA aunque se han identificado algunos factores de riesgo. Entre los factores de riesgo sistémicos se incluyen la susceptibilidad genética, grupo étnico, sexo, edad y nutrición. El principal factor de riesgo es la edad [3]. También son importantes los factores locales como la historia de daño articular previo, debilidad muscular o deformidad articular, pudiendo ser causantes de una alteración en la carga articular y por lo tanto, elevando el riesgo de desarrollar OA. Además, el incremento de la carga producido por el sobrepeso o la práctica de actividad física perjudicial también aumentan las posibilidades de aparición de OA [4]. A pesar del conocimiento de estos factores de riesgo, los mecanismos principales implicados en el desarrollo de la OA todavía están por dilucidar.

Lo que parece estar claro es que en la OA no estamos ante un único evento como principal causante del daño, si no que nos enfrentamos a múltiples desencadenantes (factores locales, sistémicos, genéticos, ambientales), los cuales se interrelacionan entre ellos y acaban desembocando en un mismo camino que conduce al desarrollo final de la OA.

Ya se ha dicho que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de OA. Con la edad se modifica la estructura de los componentes de la ECM, lo que altera sus propiedades biomecánicas [5]. El tamaño de las moléculas de agregano se reduce y esto hace que la ECM retenga menos agua y la resistencia del cartílago se vea afectada [6]. También se ven afectados los condrocitos, se produce un aumento del catabolismo mediante el aumento de la expresión de interleuquinas (IL) IL-1, IL-6 y metaloproteinasas de matriz (MMPs), además hay un descenso en la actividad anabólica del condrocito, como lo demuestra un déficit en la respuesta al factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) [7]. En líneas generales, con el envejecimiento se produce un desequilibrio a favor del catabolismo, los condrocitos pierden su capacidad reparativa y se produce una pérdida de la flexibilidad del cartílago. Todo ello, en presencia de otros factores de riesgo, crea un escenario favorable a la aparición de OA [7, 8].

Se sabe con certeza que hay múltiples factores mecánicos que pueden favorecer la aparición de daño en el cartílago. El aumento de presión en el cartílago puede alterar la estructura de la ECM y mediante mecanorreceptores, activar señales que inducen la expresión de citoquinas, activando el catabolismo [9]. Esto explicaría la elevada incidencia de OA de rodilla en personas obesas [10, 11]. Con el envejecimiento se producen cambios en la laxitud de los ligamentos y la fuerza muscular decae, lo que

contribuye a una distribución anormal de la presión en el cartílago. Esto puede llevar a la aparición de fisuras en el mismo.

El hueso subcondral también juega un papel relevante en la OA. La sobrecarga mecánica puede producir microfracturas en el hueso que conllevan un aumento de la remodelación [12]. Esto cambiaría la síntesis de factores de crecimiento que serían los causantes de la esclerosis del hueso subcondral y de la aparición de osteofitos.

La incidencia de OA en mujeres postmenopáusicas sugiere la existencia de factores hormonales implicados en la aparición de OA. Los condrocitos poseen receptores de estrógenos y la estimulación de los mismos induce la síntesis de factores de crecimiento [13]. Además, se ha descrito que los estrógenos son capaces de interferir la secreción de IL-1 en condrocitos [14]. En distintos modelos animales se ha visto que el déficit de estrógenos conduce a la aparición de cambios artrósicos [15].

En resumen, todos los factores que se acaban de comentar (envejecimiento, sobrecarga mecánica, factores hormonales) tienen algo en común, se produce una alteración en el metabolismo del cartílago con la consiguiente liberación de citoquinas que conduciría a un aumento del catabolismo y la creación de un contexto inflamatorio que favorecería la aparición del daño artrósico [16].

En la OA hay diferentes tejidos implicados: cartílago, tejido sinovial y hueso (Figura 1). Las principales alteraciones que se

producen en la OA son la degradación del cartílago hasta su desaparición, fibrosis sinovial, esclerosis del hueso subcondral y la aparición de osteofitos en los márgenes articulares [17].

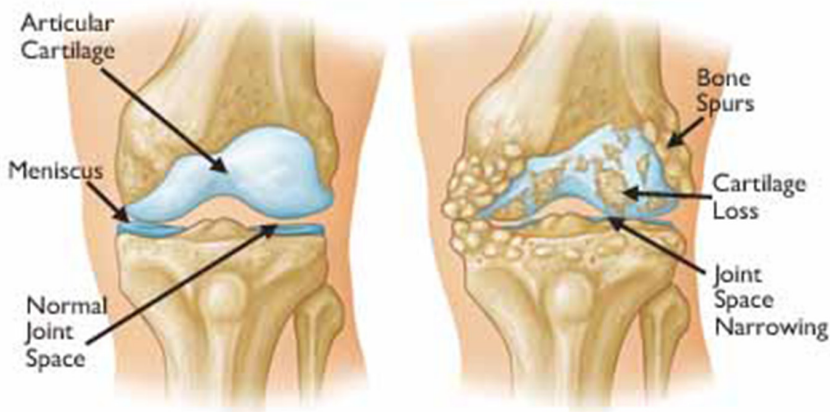


Figura 1. Representación esquemática de la artrosis. La parte izquierda de la figura muestra una articulación sana mientras que la parte derecha representa una articulación artrósica, en la que se evidencia una pérdida de cartílago con el consiguiente adelgazamiento del espacio articular y la aparición de osteofitos

Podemos encontrarnos casos de OA en los que no hay manifestaciones clínicas y sólo hay evidencia de cambios estructurales o alteraciones radiológicas, esto es lo que se define como OA radiográfica. Aunque lo habitual es que la OA se acompañe de una serie de características clínicas como son la presencia de dolor articular, rigidez, episodios de inflamación y en última instancia, deformidad y pérdida de función articular.

1.3 Cartílago

Aunque la OA sea considerada como una enfermedad que afecta al conjunto de la articulación, incluyendo cartílago articular, hueso y tejido sinovial, el principal protagonista es el cartílago. El cartílago es un tejido con una muy limitada capacidad reparativa. En consecuencia, el daño del cartílago conduce a una enfermedad progresiva. Esto hace que sea de especial relevancia el tratar el daño del cartílago en fases precoces, para evitar que éste avance.

El cartílago es un tejido avascular que obtiene sus nutrientes del tejido sinovial. El agua es el componente más abundante del cartílago articular, representando hasta el 80% del peso del cartílago [18]. Los condrocitos son las únicas células presentes en el cartílago y se encuentran sumergidos en la ECM que está compuesta principalmente por colágeno y proteoglicanos [19]. El colágeno es la molécula estructural más abundante de la ECM, aportando en torno al 60% del peso seco del cartílago. El colágeno tipo II constituye en torno al 95% del colágeno presente en el cartílago articular y es el encargado de aportar la característica resistencia a la tracción [20]. Los proteoglicanos son el segundo grupo de macromoléculas en la ECM, siendo el agregano el proteoglicano de mayor tamaño y el más abundante, representando alrededor del 10-15% del peso seco del cartílago. El agregano se asocia con el ácido hialurónico para formar agregados y así conferir el soporte estructural y rigidez al tejido, esto lo consigue mediante la retención de agua en la matriz [21].

En humanos, el cartílago se compone de tres zonas bien definidas: superficial, media y profunda, cada una de ellas con una composición diferente (Figura 2). En la zona superficial los condrocitos en forma de disco y las fibras de colágeno se orientan de forma paralela a la superficie articular, mientras que en las zonas media y profunda los condrocitos adoptan una forma esférica y las fibras de colágeno pasan a tener una disposición perpendicular a la superficie articular [17]. La zona profunda está separada de la zona calcificada por medio de la línea de marea (tidemark). La zona calcificada es la encargada de anclar las fibras de colágeno de la zona profunda al hueso subcondral [22].

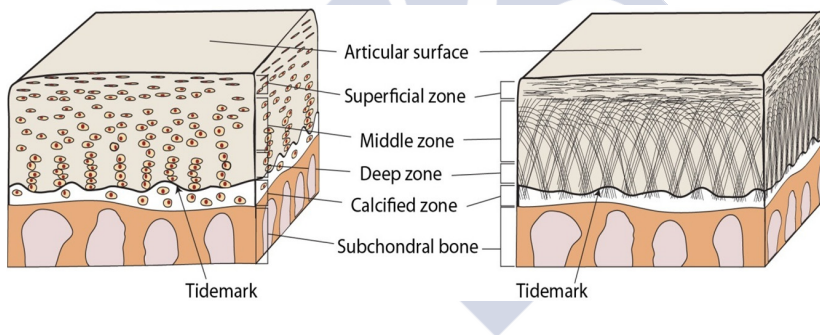


Figura 2. Representación gráfica del cartílago humano. La imagen de la izquierda muestra la organización de los condrocitos. En la zona superficial los condrocitos son pequeños y aplanados y están orientados paralelamente a la superficie articular. En la zona media los condrocitos son redondeados y están dispuestos de forma aleatoria. En la zona profunda los condrocitos están agrupados en columnas y grupos isogénicos. En la imagen de la derecha se representa la orientación de las fibras de colágeno. En la zona superficial las fibras de tamaño pequeño y medio se orientan paralelas a la superficie articular. En las zonas media y profunda las fibras se agrupan y se orientan de forma perpendicular a la superficie articular

1.3.1 Cartílago y OA

Se pueden destacar varias características distintivas en el daño que se produce en el cartílago en la OA. A diferencia de lo que cabría esperar, se ha visto que hay un aumento en la síntesis de moléculas de la matriz. De todos modos, con el tiempo, la degradación de la matriz supera a la síntesis de nuevas moléculas, lo que hace que el balance neto sea negativo. En la OA precoz la superficie del cartílago todavía se muestra intacta, aunque se pueden apreciar áreas de edema localizado o incluso pequeñas fisuras. Es ahí cuando los condrocitos empiezan a proliferar y se forman grupos isogénicos. Además, se pueden detectar condrocitos hipertróficos. Posteriormente, la zona superficial muestra fisuras y pérdida de condrocitos. Las fisuras se agrandan y se extienden a la zona media, comenzando a aparecer erosiones, pérdida de cartílago y, finalmente, deformidad [23].

Los condrocitos son los encargados de regular la homeostasis del cartílago articular, siendo los encargados de sintetizar colágeno, proteoglicanos y proteinasas. La OA es el resultado del fallo de los condrocitos a la hora de mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la ECM [24].

En la OA, la pérdida de calidad de la matriz se debe a alteraciones en el proceso de diferenciación de los condrocitos [25]. Esto implicaría una disminución en la expresión de colágeno tipo II y agrecano y un aumento en la expresión de la

MMP13. Hay un incremento en la síntesis de proteinasas que degradan el colágeno y agrecano y un descenso en la expresión de los inhibidores de estas metaloproteinasas (TIMPs).

Los condrocitos pueden ser estimulados por citoquinas catabólicas para así liberar productos que degradan y dañan el cartílago. En los años 80 se sugirió que la catabolina, hoy conocida como interleuquina-1 (IL-1), podría jugar un papel en la OA. Distintos trabajos describieron su capacidad para inducir metaloproteinasas en cartílago y poder estimular a los condrocitos para degradar tanto colágeno como proteoglicanos [26, 27]. A día de hoy todavía no está perfilado el mecanismo exacto por el cual el condrocito se activa en la OA, pero la IL-1 β se ha postulado como un mediador fundamental en este proceso [28]. IL-1 β promueve el daño en el cartílago mediante un incremento en la actividad enzimática e inducción del proceso inflamatorio, al mismo tiempo que inhibe la síntesis de inhibidores enzimáticos [29]. IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) son capaces de inducir a los condrocitos para que generen óxido nítrico (NO) [30], metaloproteinasas de matriz [31] y agrecanasas [32] y fomentan la inhibición de la síntesis de agrecano y colágeno tipo II [33-37].

Un aumento en la degradación no implica necesariamente que se produzca un daño en el cartílago, siempre y cuando esto se compense con un aumento en la síntesis. Además de factores catabólicos, los condrocitos también expresan factores

anabólicos, como pueden ser IGF-1 y TGF- β , los cuales estimulan la producción de matriz extracelular [38-41]. En la OA precoz se ha descrito un aumento de la actividad anabólica, acompañada de un aumento en la expresión de TGF- β [42, 43]. Este incremento en la producción de componentes de la ECM sugiere que la OA es algo más que un proceso en el que se acelera la degradación del cartílago.

En cartílago artrósico, el condrocito presenta un patrón de expresión de citoquinas y factores de crecimiento diferente al del condrocito sano. De hecho, los condrocitos procedentes de tejido artrósico expresan mayores niveles de IL-1 α y β y del receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI), mientras que la expresión del receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII), supresor de la actividad de IL-1 está disminuida [44, 45]. De esta forma, no sólo hay mayores niveles de IL-1 en OA, si no que además los condrocitos son más sensibles a IL-1 y por lo tanto, la susceptibilidad al daño inducido por IL-1 se encuentra aumentada. En cartílago sano se vio que los condrocitos podían contrarrestar los efectos de IL-1 con TGF- β pero con la edad esta habilidad disminuía [46].

1.4 Tejido sinovial

El tejido sinovial juega un papel relevante en la patogenia de la OA. En las articulaciones artrósicas se produce una hiperplasia y fibrosis del tejido sinovial [47]. Además, en la OA se ha descrito la presencia de inflamación del tejido sinovial, hecho que se

pensaba prácticamente exclusivo de la artritis reumatoide. En la OA precoz se produce una infiltración mononuclear y se detectan en tejido sinovial citoquinas proinflamatorias y mediadores del daño articular [48, 49]. Existe una correlación entre el grado de inflamación y la severidad de la condropatía, lo que indicaría que la inflamación podría ser un factor predictivo en la OA [50]. En pacientes con OA precoz, el tejido sinovial inflamado libera citoquinas catabólicas como IL-1 α , IL-1 β y TNF- α [49, 50]. La correlación entre sinovitis y condropatía y la liberación de citoquinas por parte del tejido sinovial son hechos que sugieren que la sinovitis contribuye al desarrollo de la OA.

1.5 Osteofitos

En la OA, además del daño del cartílago y la fibrosis sinovial, muchas veces aparecen osteofitos. Los osteofitos aparecen en los márgenes articulares. Se piensa que son el resultado de células mesenquimales presentes en el periósteo, activadas mediante estímulos biomecánicos para que se produzca una condrogénesis. Se ha dividido el proceso de desarrollo de osteofitos en cuatro fases. La fase I comenzaría con una condensación de células mesenquimales y la expresión de colágeno tipo II y agregano. La fase II consistiría en la aparición de tejido fibroso y colágeno tipo I. En la fase III se observa una organización zonal y los condrocitos se hipertrofian. Por último, en la fase IV en la que aparece el osteofito maduro en el que se evidencia la expresión

de colágeno tipo II, agrecano y colágeno tipo IX [51]. Todavía no está claro si los osteofitos tienen un efecto positivo o negativo en la OA. Los osteofitos se han asociado con una alineación alterada de la articulación, limitación de la movilidad y un riesgo incrementado de progresión estructural en la OA [4]. Por otra parte, pacientes con varo tienen osteofitos mediales de gran tamaño. Se demostró que la extirpación de los osteofitos en estos pacientes aumentaba el varo, sugiriendo que los osteofitos ayudaban a estabilizar la articulación [52]. No está claro si el desarrollo de osteofitos es un mecanismo compensatorio que trata de estabilizar la articulación artrósica o si se trata de un daño colateral. También puede tratarse de una combinación de ambos, inicialmente los osteofitos tratan de estabilizar la articulación pero con el avance de la OA acaban siendo perjudiciales.

1.6 TGF- β

La familia de TGF- β está constituida por más de 40 miembros e incluye además de TGF- β s, activinas y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) [53]. Estas moléculas actúan como reguladores de un amplio rango de procesos, jugando un papel básico en el desarrollo y homeostasis de múltiples tejidos, regulando la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y migración, así como la síntesis de la ECM y su degradación. Además, regulan la

respuesta reparativa de distintos tejidos y modulan la función inmunológica [54].

El primer miembro de la familia, identificado en 1983, fue TGF- β , y se denominó así por su capacidad para transformar el crecimiento de fibroblastos en cultivo [55, 56]. El TGF- β es una proteína de 25 kDa y está considerada como una citoquina multifuncional debido a los variados efectos que tiene sobre diferentes tipos celulares. Es un inhibidor muy potente de la proliferación de células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides y endoteliales. Alternativamente, puede inducir la proliferación de fibroblastos [57]. Además, estimula la síntesis y depósito de proteínas de la ECM por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales e induce la expresión de integrinas y receptores que regulan las interacciones con proteínas de la ECM [58]. También participa en otros procesos como puede ser la regulación de factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular. En resumen, TGF- β posee un gran número de funciones, las cuales dependen de múltiples factores, como puede ser el estado de activación celular, el nivel de expresión de otras citoquinas o las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa.

En mamíferos hay tres isoformas de TGF- β , β 1, β 2 y β 3. Entre TGF- β 1 y TGF- β 2 existe una homología del 70% de los aminoácidos, mientras que entre TGF- β 2 y TGF- β 3 es del 79% [59, 60]. TGF- β 1 y TGF- β 2 muestran una gran similitud

conformacional, si bien presentan diferencias en cuanto a su estructura local y flexibilidad lo que parece estar relacionado con diferencias en la unión al receptor y en las señales de transducción inducidas [61, 62]. Además, la expresión de las tres isoformas está sometida a distintos mecanismos reguladores ya que poseen promotores diferentes [59, 63, 64]. Se han descrito diferentes fenotipos para ratones knockout de cada isoforma [65] y se demostró que las isoformas de TGF- β muestran diferentes patrones de expresión en tejidos en desarrollo y procesos reparativos [66]. Por desgracia, la mayoría de los estudios obvian estas diferencias y sólo se estudia TGF- β 1. De forma que cuando se hace referencia a TGF- β , en realidad se trata de TGF- β 1 y sólo raramente se dispone de información sobre las otras dos isoformas. Esto hace que sea difícil sacar conclusiones sobre la participación de TGF- β 2 y TGF- β 3 en la OA.

TGF- β se secreta como un compuesto inactivo compuesto por un dímero de TGF- β y un péptido asociado de latencia (LAP) [67, 68]. Por lo tanto, TGF- β requiere liberarse de LAP para activarse y así poder unirse a su receptor [69]. La activación puede ser inducida por mecanismos físicos (acidificación, alcalinización, calor) o por mecanismos biológicos (proteólisis, interacciones proteicas) [69-72].

El TGF- β activado se une al receptor de TGF- β tipo 2 (TGFBR2) para formar un complejo que recluta al receptor de

TGF- β tipo 1 (TGF- β R1 o ALK5), el cual se activa mediante fosforilación [54].

Tras la fosforilación del receptor, SMAD2 y SMAD3 se acoplan al mismo y también son fosforilados. Las formas fosforiladas de SMAD2 y SMAD3 forman un complejo con el Co-SMAD, SMAD4 y son transportadas al núcleo donde ejercen su efecto a nivel transcripcional, activando diferentes genes [54, 73, 74]. Por lo tanto, SMAD2 y SMAD3 son los encargados de llevar la señal de TGF- β al núcleo y actúan como reguladores de múltiples procesos, como pueden ser la proliferación, apoptosis y diferenciación celular, mediante la regulación de la expresión genética.

Los SMADs inhibitorios (SMAD 6 y SMAD7) pueden inhibir la vía de TGF- β interfiriendo en la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 (Figura 3). PPM1A es una fosfatasa capaz de revertir la fosforilación de SMAD 2 y SMAD3 [75].

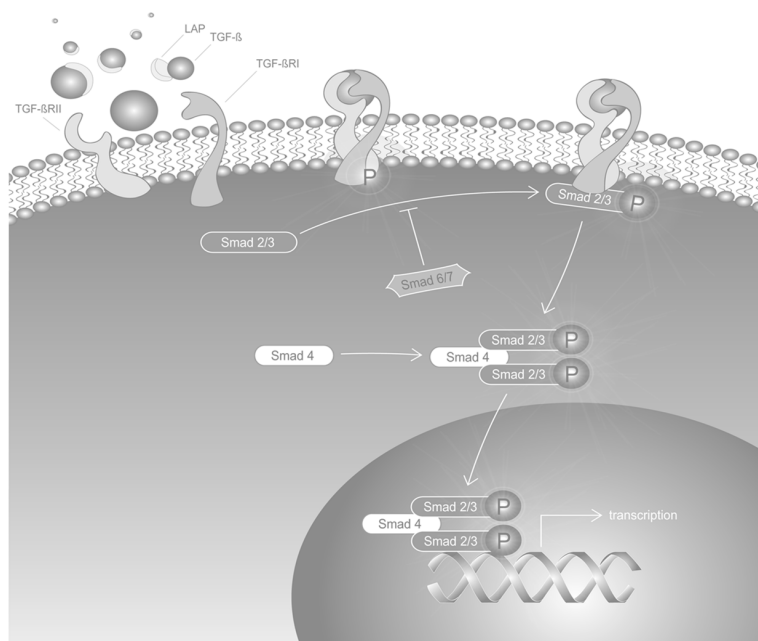


Figura 3. Representación de la vía de señalización de TGF- β . TGF- β se secreta como forma latente asociada a LAP. Cuando se libera de LAP, TGF- β se une al TGF- β R2. Entonces se produce un acoplamiento de TGF- β R2 con TGF- β R1, siendo este último fosforilado. SMAD2 y SMAD3 se unen a este complejo y a su vez, también son fosforiladas. Las formas fosforiladas de SMAD2 y SMAD3 se unen al Co-SMAD, SMAD4 y se dirigen al núcleo donde inducen la activación transcripcional. Los SMAD inhibidores, SMAD6 y SMAD7, pueden inhibir esta ruta

Esta descripción correspondería a la vía canónica de señalización de TGF- β , pero se ha visto que TGF- β puede ejercer otros efectos por vías alternativas. Además del TGF- β R1 ya descrito, también conocido como ALK5, se ha demostrado la existencia de otro TGF- β R1, ALK1, que induce la fosforilación de otros

SMADs que suelen ser activados por BMPs (factores de crecimiento también pertenecientes a la familia de TGF- β), SMAD1, SMAD 5 y SMAD8, produciendo efectos opuestos a los de la vía canónica (Figura 4) [76-78]. En concreto se vio que ALK1 era un inductor de la proliferación de células endoteliales, mientras que ALK5 inhibía ese efecto [76]. Cabría esperar que TGF- β pudiera ejercer efectos contrapuestos en cartílago en función del receptor a través del cual transmitiera su señal.

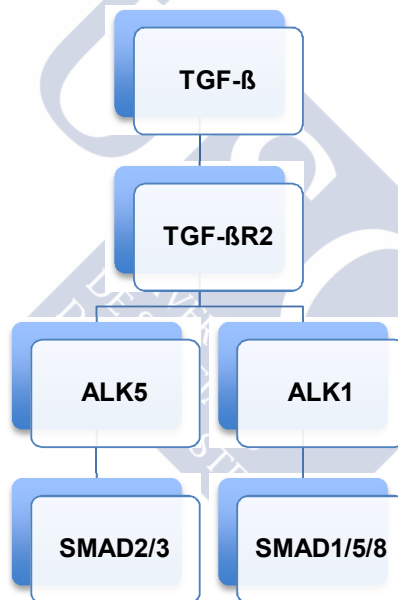


Figura 4. TGF- β puede ejercer su efecto a través de dos TGF- β R1, ALK5 y ALK1, con efectos contrapuestos. La vía tradicional sería la de ALK5 con la consiguiente activación de SMAD2/3. La ruta alternativa es a través de ALK1, activándose SMAD1/5/8

TGF- β también puede ejercer su efecto a través de rutas independientes de los SMADs en la que estarían implicadas otras

quinasas, ERK, JNK y p38 MAPK [79, 80]. Se ha visto que estas vías de señalización pueden interactuar con otras rutas de TGF- β [74, 80]. ERK y JNK son capaces de inducir la fosforilación de los SMADs, regular la expresión de SMAD7 e incluso pueden interactuar a nivel nuclear con los complejos de SMADs y los factores de transcripción [81]. La activación de MAPK no es exclusiva de TGF- β y puede deberse a otros estímulos como IL-1 y TNF- α . EL hecho de que TGF- β sea capaz de ejercer su efecto por distintas vías de señalización genera una dificultad añadida a la hora de estudiar esta molécula.

1.6.1 TGF- β y cartílago

TGF- β juega un papel clave en la condrogénesis. TGF- β induce la condensación de células mesenquimales [82] y es un regulador clave de la diferenciación y maduración de los condrocitos [83].

Del mismo modo, TGF- β también juega un papel crucial en la homeostasis del cartílago, a la hora de mantener el equilibrio existente entre los factores anabólicos y catabólicos presentes en cartílago. TGF- β estimula la producción de proteínas de la ECM y al mismo tiempo es capaz de bloquear la degradación de las mismas. En la misma línea, TGF- β es capaz de contrarrestar la degradación del cartílago inducida por IL-1 y TNF- α [84, 85].

1.6.2 TGF- β y OA

Históricamente se le ha asignado a TGF- β un papel protector en cartílago y se pensaba que un descenso en los niveles de expresión de TGF- β podían favorecer el desarrollo de la OA. De un tiempo a esta parte, cada vez hay más evidencia científica que induce a pensar que esta teoría no está tan clara, que incluso se podría pensar que en la OA TGF- β pierde su función homeostática y pasaría a ser un promotor del daño que se produce en el cartílago.

1.6.2.1 Efecto protector

El papel como agente protector del cartílago se basa en diferentes trabajos en los que se vio que TGF- β era un potente inductor de la respuesta anabólica por parte del condrocito y además era capaz de antagonizar los efectos catabólicos de TNF- α y de IL-1 [84, 86, 87]. Consistente con esta idea, se vio que había un incremento de la expresión de TGF- β en un modelo experimental de OA y que al bloquear TGF- β se producía un incremento en la pérdida de proteoglicanos y un mayor adelgazamiento del cartílago [88]. También corrobora la hipótesis del efecto protector de TGF- β en cartílago lo descrito con la asporina. La asporina es una proteína perteneciente a la familia de los proteoglicanos de pequeño tamaño ricos en leucina (SLRPs) y cuyo papel funcional es modular la vía de señalización de TGF- β . Mediante el secuestro de TGF- β en la ECM, evita su

unión al TGF- β R [89, 90], inhibiendo su señal. Se vio que un alelo de la asporina se encontraba incrementado de forma significativa en pacientes con OA de rodilla en comparación con controles [91]. En el mismo trabajo se vio que la asporina con el alelo más prevalente en la OA inhibía TGF- β de forma más intensa que el otro alelo [91]. Se podría deducir que al ser TGF- β secuestrado por la asporina se incrementa el riesgo de padecer OA [92]. Esto iría en la línea de trabajos que han descrito un descenso en la expresión de TGF- β 1 [93], TGF- β 2 y TGF- β 3 [94] en cartílago humano artrósico. También apoyan el efecto protector de TGF- β en cartílago humano otros estudios en los que se vio que había un descenso de los niveles de TGF- β R2 en cartílago humano artrósico [93] o en los que se demostró una correlación positiva entre la expresión de ALK5 y la de agregano y colágeno tipo II. Sin embargo, ninguno de estos últimos hallazgos es tan claro como para que se pueda considerar como definitivo. Algunos, porque no se confirman en otros estudios, como las diferencias en los niveles de expresión de TGF- β [93-96] . Otros, porque no tienen una clara interpretación, como la correlación entre la expresión de ALK5 y la de agregano y colágeno tipo II.

1.6.2.2 Efecto deletéreo

De hecho, hay toda una serie de evidencias que apoyan la hipótesis contraria, la posibilidad de que TGF- β esté ejerciendo un efecto deletéreo en el cartílago. Se ha descrito que TGF- β y

SMAD3 producen un descenso en la actividad de miR-140 en condrocitos humanos [97]. MiR-140 es un microRNA presente en cartílago [98], que disminuye la expresión de genes que ejercen un papel negativo en el cartílago artrósico, como puede ser MMP13. En este escenario TGF- β estaría induciendo un daño en cartílago de forma indirecta. En otro trabajo se determinó que TGF- β era capaz de incrementar los niveles de expresión de MMP13 en cultivos de condrocitos [99]. Este efecto también se ha descrito en más tejidos. TGF- β incrementó los niveles de MMP13 en células de carcinoma escamoso, células de cáncer de mama, fibroblastos gingivales y osteoblastos [100-103]. En modelos de ratón se vio que el exceso de TGF- β provocaba cambios artrósicos como la presencia de hiperplasia sinovial y la aparición de osteofitos [104-106].

Una hipótesis que trata de explicar cómo TGF- β pierde el efecto protector y se transforma en un factor contribuyente al desarrollo de la OA se basa en que la señal de TGF- β se produciría a través de una ruta alternativa, mediante la estimulación de ALK1, desplazando a la vía canónica, o lo que es lo mismo, la que va a través de ALK5. En un modelo de ratón se vio que con el envejecimiento se producía un incremento en el ratio ALK1/ALK5 y además se demostró que en cartílago humano había una fuerte correlación entre los niveles de ALK1 y MMP13, mientras que ALK5 se correlacionó con los niveles de agregano y colágeno tipo II [107]. El efecto contrapuesto de

ALK5 y ALK1 en condrocitos humanos se refrendó en otros trabajos [108].

Por lo tanto, el efecto de TGF- β puede resultar un tanto confuso. Una teoría conciliadora que trataría de justificar la ambigüedad de TGF- β es que los niveles de TGF- β presentan un estrecho margen y niveles por encima o por debajo del mismo podrían condicionar la aparición de daño en el cartílago [109]. Esta hipótesis es la que tiene menos soporte experimental.

1.7 Estudios de expresión en cartílago humano

Los estudios de expresión en cartílago humano han supuesto un enorme reto a causa de las dificultades técnicas que se plantean al trabajar con cartílago. Un problema complejo es la dificultad para extraer ARN del cartílago debido a sus peculiares características, como son el bajo contenido celular, la ECM compuesta por colágeno y la riqueza en proteoglicanos, los cuales contaminan la extracción de ARN [110]. Se han descrito varios métodos que pretenden mejorar el rendimiento de la extracción y formas de realizar la amplificación de ADN complementario mediante transcripción *in vitro* que pretenden compensar la escasa cantidad de ARN obtenida [110-113].

En la actualidad se dispone de técnicas que permiten lograr una cuantificación precisa de la expresión de una molécula, como pueden ser los microarrays, en el caso de que se estudien un gran

número de genes, o la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), para estudiar genes de forma individual [114-116]. Por lo tanto, la qPCR es una buena técnica a la hora de estudiar un número reducido de genes o para validar los resultados de los microarrays. De todos modos, hay que tomar ciertas medidas para que los resultados de la qPCR sean óptimos [117, 118].

La qPCR permitiría realizar una cuantificación absoluta del ARN, pero esto raramente se hace debido a la variabilidad entre muestras en el rendimiento de la extracción de ARN y en las eficiencias de la transcripción inversa y de la PCR. Además, la necesidad de realizar curvas de calibración específicas para cada gen hacen que esta técnica sea muy complicada de llevar a cabo [118, 119].

La alternativa más extendida es la cuantificación relativa, en la que es necesario normalizar los resultados obtenidos. Esto es debido a que al extraer ARN se pueden copurificar contaminantes que pueden interferir en la RT-PCR, afectando a la eficiencia de la reacción. También hay que tener en cuenta la imprecisión en el pipeteo que puede hacer que se carguen diferentes cantidades de ARN en cada reacción. Hay diferentes métodos de normalización y estos no son excluyentes entre sí:

- Emplear un tamaño de muestra similar. Es el primer paso para tratar de minimizar el error experimental. Se trata de utilizar el mismo volumen o peso en todas las muestras.

Este método es claramente insuficiente ya que no todas las muestras contienen el mismo material celular y por lo tanto, a pesar de ajustar las muestras por tamaño, obtendríamos diferentes cantidades de ARN en cada extracción.

- Usar la misma concentración de ARN. Una vez extraído el ARN, se cuantifica y se carga la misma cantidad de ARN en cada reacción. Además de cuantificar el ARN hay que tener en cuenta la calidad del ARN extraído ya que si no alcanza un mínimo se puede ver alterada la cuantificación del mismo. Con este método no se controla la posible variabilidad en las eficiencias de la RT y la PCR. Además, hay que tener en cuenta que el 80% del ARN celular es ARNr y sólo un 2-5% es ARNm. El ratio ARNr/ARNm puede variar entre las muestras lo que podría alterar los resultados de la qPCR [120].
- Genes de referencia. Es el método más popular ya que controla todos los pasos del proceso, desde el inicio de la extracción de ARN. Mediante qPCR se cuantifica la expresión tanto del gen problema como la del gen de referencia y se normalizan los resultados del primero con el segundo. Con esto se consiguen corregir las diferencias en la carga de ARN y las desigualdades en la eficiencia de

la RT-PCR. Esto es así, siempre y cuando la expresión del gen de referencia sea estable.

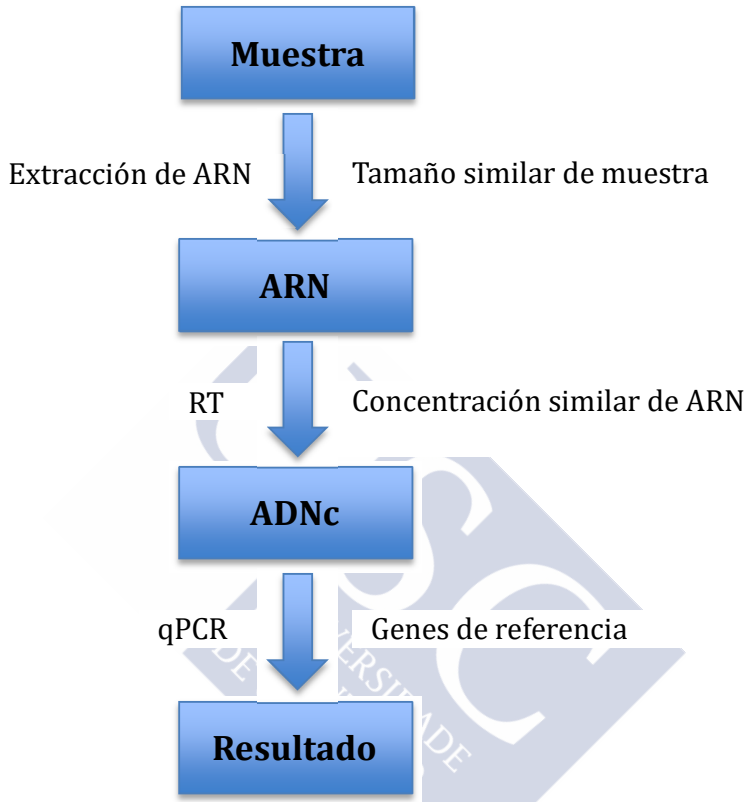


Figura 5. Métodos de normalización de la qPCR

Por lo tanto, la forma más extendida de normalización de los resultados de qPCR es el uso de genes de referencia, lo que permite la comparación entre muestras, pero no entre genes. Es muy importante señalar que la selección de los genes de referencia es crítica, ya que su expresión tiene que ser estable en las condiciones del estudio [121-123].

Los genes de referencias más usados en investigación fueron seleccionados porque son genes housekeeping, o lo que es lo mismo, se expresan de forma constitutiva en muchos tejidos y en distintas etapas del desarrollo. De todos modos, se ha visto que estos genes están sometidos a regulación [119]. Los genes de referencia empleados en qPCR fueron arrastrados de técnicas anteriores, se empleaban para normalizar los resultados de Northern-blot o de ensayos de protección de ribonucleasas, pero la qPCR es una técnica mucho más sensible, pequeños cambios en los niveles de expresión de genes de referencia pueden conducir a obtener conclusiones erróneas [123-126]. Por lo tanto, se debería comprobar la estabilidad de los genes de referencia para cada tejido y para cada tipo de experimento [121, 127, 128]. No sólo eso, si no que la mayoría de los trabajos que han tratado de identificar buenos genes de referencia han llegado a la conclusión de que es necesario emplear más de un gen de referencia para obtener unos resultados óptimos [127, 129].

Hasta el momento de abordar esta cuestión, no se había estudiado la idoneidad de los genes de referencia en cartílago humano.



2 OBJETIVOS



OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento acerca de la participación de TGF- β en el desarrollo de la OA.

2.2 Objetivos específicos

- Objetivo 1: establecer una colección de muestras de cartílago humano artrósico y sano procedentes de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia de cadera.
- Objetivo 2: identificar los genes de referencia más estables para su uso en qPCR.
- Objetivo 3: determinar los niveles de expresión de las isoformas de TGF- β en cartílago humano artrósico.
- Objetivo 4: determinar los niveles de expresión de SMAD2, SMAD3 y PPM1A en cartílago humano artrósico.
- Objetivo 5: determinar los niveles de expresión de ALK1, ALK5 y TGFBR2 en cartílago humano artrósico.





3 MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de muestras de cartílago

3.1.1 Estudio de genes de referencia

Se obtuvo cartílago articular humano de las cabezas femorales y platillos tibiales de pacientes sometidos a artroplastia. Los motivos para proceder al recambio articular fueron la presencia de OA primaria o la fractura del cuello femoral. Se revisó la historia clínica, incluidas las pruebas de imagen y se entrevistó a cada uno de los pacientes sometiéndolos a un cuestionario específico. Toda la información se recopiló en una base de datos diseñada para tal efecto (Figura 6).

Se confirmó el diagnóstico en base a los hallazgos macroscópicos de la pieza extraída. No se realizó estudio histológico. El grupo control estaba constituido por los pacientes con fractura de cabeza femoral, sólo fueron seleccionados aquéllos en los que se excluyó historia de enfermedad articular previa, hallazgos radiológicos o evidencia macroscópica de lesión articular. No se seleccionó a ningún paciente en los que hubiera alguna duda sobre si padecían o no OA.

Tras la selección se emplearon 10 cabezas femorales artrósicas, 8 rodillas artrósicas y 10 cabezas femorales fracturadas como controles. Las muestras se ajustaron por edad y sexo. No se dispuso de rodillas control. Las principales características de los

MATERIALES Y MÉTODOS

donantes de cartílago se muestran en la tabla 1. El estudio se realizó con la aprobación del Comité Ético para Investigación Clínica de Galicia y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

Cuestionario de pacientes donantes de cartilago

T.I. NHC Fecha de nacimiento

Apellidos Nombre

Lugar de nacimiento Profesión

Sexo Edad

Familiares con artrosis Antecedentes de cirugía

Cirugía ortopédica

Fecha Localización

Tipo Motivo

Cirugía ortopédica previa

Diagnóstico previo

Medicación anticoagulante

Causas de artrosis secundaria

Ubicación de artrosis

Diagrama de localización de artrosis:

Botones de navegación:

- Caso
- Control
- Bater
- Cauceiro
- Items
- 80°
- A.P.
- Sangre
- Cuestionario
- Consentimiento

Fecha de inicio

Escala de Collins

Figura 6. Página de recogida de información del paciente participante en el estudio

Tabla 1. Características de los donantes de cartílago incluidos en el estudio de genes de referencia

	Rodilla OA	Cadera OA	Cadera control
No. de pacientes	8	10	10
Edad, mediana (rango), años	72 (67-77)	75 (66-85)	81 (72-91)
No. varones/hembras	5/3	5/5	3/7
Escala de Collins, media (rango)	3.4 (2-4)	3.7 (2-4)	0.7 (0-1)

3.1.2 Estudio de la ruta de TGF- β

Se obtuvieron muestras de cartílago de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia, bien por OA o por fractura de cabeza femoral. Al igual que para el estudio de los genes de referencia, se clasificó a los pacientes en base a la historia clínica, estudios de imagen y hallazgos macroscópicos de la pieza obtenida. En este estudio además se realizó histología de todas las piezas. Para que los pacientes con fractura pudieran ser catalogados como controles, se excluyó la presencia de cualquier enfermedad articular. Las características de los pacientes seleccionados se muestran en la tabla 2. Se contó con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia y todos los pacientes dieron el consentimiento informado.

Tabla 2. Características de los donantes de cartílago incluidos en el estudio de la ruta de TGF- β

	Cadera OA	Cadera control
No. de pacientes	11	11
Edad, mediana (rango), años	74 (60-85)	83 (71-90)
No. varones/hembras	6/5	5/6
Escala de Collins, media (rango)	4 (4)	0.66 (0-1)

3.2 Disección de cartílago y evaluación

Se acudió al quirófano para obtener las cabezas femorales y rodillas. Las piezas se lavaron in situ y se conservaron en tampón fosfato salino (PBS) estéril a 4°C. Se examinó la superficie del cartílago, realizando una valoración macroscópica aplicando la escala de Collins modificada por Muehleman [130] que se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Escala de Collins modificada por Muehleman

Grado	Descripción
0	Sin evidencia de lesión
1	Fisuras pequeñas de la superficie sin cambios en la geometría
2	Fisuras profundas, osteofitos pequeños
3	Fisuras extensas con menos del 30% de superficie erosionada hasta hueso subcondral, osteofitos
4	Más del 30% de superficie erosionada hasta hueso subcondral, osteofitos grandes y cambios geométricos groseros

A efectos de clasificación se consideraron controles los cartílagos con grado 0-1, mientras que los cartílagos con grado 2 o superior se catalogaron como artrósicos.

Teniendo en cuenta el estado avanzado de OA que nos encontramos en algunos casos, hubo piezas en las que había extensas áreas articulares sin cartílago (Figura 7). Se procedió a diseccionar el cartílago con un bisturí, troceándolo en piezas de 2-5 mm y congelándolo instantáneamente en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlo en un congelador a -80°C. Se tuvo mucho cuidado en excluir tejido fibrótico y hueso subcondral. Todo esto se realizaba el mismo día de la cirugía.

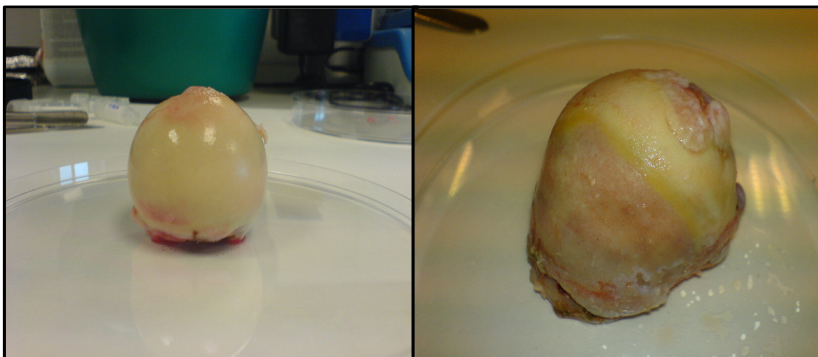


Figura 7. Cabezas femorales empleadas en el estudio. A la izquierda se muestra una cabeza femoral sana en la que se aprecia una superficie del cartílago lisa y a la derecha se ve una cabeza femoral con un grado de OA avanzada en la que se evidencia una gran área de hueso subcondral expuesto y zonas de tejido fibrótico

Además, para los estudios de la ruta de TGF- β se coleccionó una muestra de cartílago para realizar un examen histológico. Para ello se obtuvo un fragmento de cada pieza que incluía hueso subcondral mediante un cuchillo diseñado a tal efecto (Figura 8), para posteriormente fijarlo en formol al 10%.

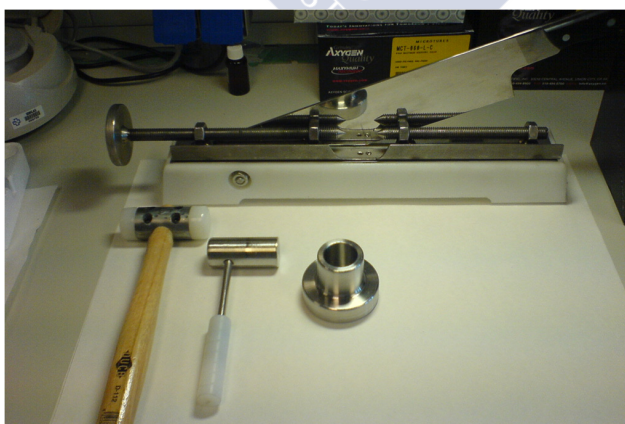


Figura 8. Cuchillo con el que se obtuvo muestra para histología y mortero con el que se trituro el cartílago para la extracción de ARN

3.3 Extracciones de ARN

Las extracciones de ARN del cartílago se hicieron siguiendo el método descrito por Price et al [111], al cual se añadió un paso de digestión con DNasa para evitar la contaminación por ADN. Primero se procedió a pesar el cartílago congelado para obtener un gramo que se trituró con un mortero (Figura 8), manteniendo el frío con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se sumergía en TRI Reagent (Sigma, Saint Louis, MO, USA) y se extraía la fase acuosa, mezclándola con etanol al 100%. Por último, esta mezcla se purificaba en una columna con membrana de gel de silicona, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la misma columna se añadía DNase I (Qiagen, Valencia, CA, USA) para realizar la digestión de ADN genómico.

La concentración de ARN aislado y el ratio de absorbancia 260/280 nm se midieron con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Las muestras con un ratio 260/280 inferior a 1.90 se desecharon.

3.4 Transcripción inversa y PCR cuantitativa

La transcripción inversa del ARN en ADN complementario se hizo en un volumen de 20 µl empleando una transcriptasa inversa (Roche Applied Science, Barcelona, España) y hexámeros al azar, siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a las

cantidades limitadas de ARN se dispuso de una cantidad de 250 ng para cada transcripción inversa. El ADN complementario se guardó a -20°C para posteriormente utilizar un volumen de 1 µl en cada qPCR. Los primers para la qPCR se diseñaron con el programa Primer3 [131]. Se seleccionaron de tal forma que cada pareja de primers estuviera en exones diferentes, para así evitar la amplificación de ADN genómico. Para realizar las qPCR se utilizó el Dynamo™ SYBR® Green qPCR kit (Fynnzymes, Espoo, Finlandia). El termociclador empleado fue el Chromo4™ real-time PCR detection system (MJ Research, Basilea, Suiza). Las qPCR se hicieron en un volumen de 10 µl y los primers se añadieron a una concentración de 0.1 µM. Las condiciones de las PCR fueron un paso inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 94°C para desnaturalización de la muestra, 15 segundos para el alineamiento del primer y 10 segundos a 72°C para la extensión. La tabla 4 muestra las condiciones de las PCR para cada set de primers.

Tabla 4. Condiciones de la PCR cuantitativa

Gen	No. de acceso	Forward primer	Reverse primer	Annealing °C	Cl ₂ Mg mM	Amplicon (bp)
HMBS	NM_000190	ggcaatgcggctgcaa	gggtacccacgcgaatcac	56	2.5	64
TBP	NM_003194	tgcacaggagccaagagtga	cacatcacagctcccacca	56	2.5	132
B2M	NM_004048	atgagtatgctgcctgtgtga	ggcatcttcaaacctcatg	56	2.5	101
ACTB	NM_001101	ggcatcctcacctgaagta	gggtgttgaaggtcctaaa	56	2.5	203
HPRT1	NM_000194	tgtctgagatgtgatgaagg	tcccctgttgactgttcatt	56	2.5	192
RPL13A	NM_012423	aaaaagcggatgggttc	cttcggtagtggatcttgg	56	4.5	168
SDHA	NM_004168	tggacctggtgtcttttgg	agtcgcagttccgatgttct	56	3.5	166
UBC	NM_021009	atcgctgtgatcgtcacttg	tccagcaaatcagcctct	64	3.5	164
18S	NM_022551	atccctgaaaagtccagca	ccctcttggtgaggtcaatg	56	2.5	186
GAPDH	NM_002046	gagccacatcgctcagacac	catgtagttaggtcaatgaagg	60	3.5	150
TGFB1	NM_000660	gcgtgctaattggtggaac	cgttgacatcaaaagataaccac	56	2.5	276
TGFB2	NM_003238	agagtgcttgaaacaacgatt	ccattgccttctgctctt	56	4.5	117
TGFB3	NM_003238	tctgggctgggaagtgggtcc	gcagatgcttcagggttcag	56	3.5	141
AGC1	NM_013227	gggttttctgtgactctgagg	ccagcagcactacctcttc	60	2.5	246
COL2A1	NM_033150	tggcagagatggagaacctg	tccttgcaactactcccaactg	56	2.5	157
SMAD2	NM_001003652	ccagtattagtgcctccgaca	tgttggtcactgtttctcca	56	2.5	179
SMAD3	NM_005902	cagagtgcctcagtgacagc	cagcctttgacgaagctcat	56	3.5	226
PPM1A	NM_021003	caccagagcctgaagtccat	gcgatactttgggtgcattt	56	2.5	249
ALK1	NM_001204	cacggactgctttgagtcct	cctcaaaagctggggtcatt	60	2.5	152
ALK5	NM_004612	tggcagtaagacatgattcagc	gcccattgcatagatgtcag	56	2.5	155
TGFR2	NM_003242	gtccttcaagcagaccgatg	caacacgtgtccttcacgc	56	2.5	157

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y todas las muestras se analizaron en la misma reacción. En todas las muestras de ARN y para cada gen, se controló la contaminación por ADN genómico mediante una reacción en la que no se añadió transcriptasa reversa. También se controló la contaminación de los reactivos mediante una reacción sin muestra. La especificidad de la amplificación se determinó mediante análisis de las curvas de disociación y con electroforesis en geles de agarosa.

3.5 Análisis de las qPCR

3.5.1 Eficiencias de las PCR y determinación del ciclo umbral

Las eficiencias de las PCR se calcularon con el programa LinRegPCR [132] a partir de los datos brutos obtenidos con el Chromo4™ real-time PCR detection system (MJ Research, Basilea, Suiza). De acuerdo con este método, la eficiencia de la PCR equivale a la pendiente de la línea recta que se obtiene en la parte logarítmica lineal de la curva de amplificación de una dilución seriada de ARN (Figura 9). Se determinó la eficiencia mediante la media del ciclo umbral (C_t) de las muestras por duplicado.

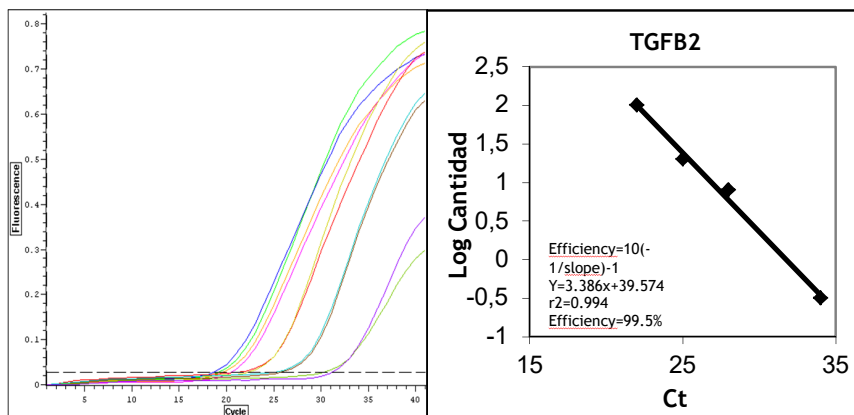


Figura 9. Ejemplo de cálculo de la eficiencia de la PCR mediante regresión lineal para TGF-β2

Los valores de Ct, el ciclo en el cual la fluorescencia de la muestra sobrepasa la fluorescencia de fondo se obtuvieron con el programa Opticon Monitor™ versión 3.0, para ello se determinó de forma manual la línea umbral que cruza la parte logarítmica lineal de la curva de fluorescencia. Las qPCR se realizaron por duplicado y se determinó el Ct medio.

3.5.2 Análisis de los datos

3.5.2.1 Estudio de los genes de referencia

Los tests de Mann-Whitney U se realizaron con el programa Statistica, versión 7 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). La estabilidad de los genes de referencia candidatos se determinó con los programas geNorm™, versión 3.4 [127] y Normfinder [129]. El programa geNorm se basa en el principio de que el ratio de

expresión de dos genes de referencia debería ser idéntico en todas las muestras, independientemente de las condiciones del experimento. geNorm calcula la medida de estabilidad de la expresión (M) para cada set de genes de referencia candidatos. Se van eliminando de forma consecutiva los genes menos estables hasta obtener la pareja de genes más estable. Además mediante este programa se estima el número mínimo de genes de referencia requeridos. Normfinder actúa de otra forma, calcula el valor de estabilidad para cada gen de forma individual, teniendo en cuenta la variabilidad entre diferentes grupos de muestras. En este caso la estabilidad se basa en una estimación combinada de la variación dentro de cada grupo y entre los distintos grupos.

3.5.2.2 Estudio de la ruta de TGF- β

Los valores de Ct obtenidos con el Opticon Monitor™ versión 3.0 se ajustaron según la eficiencia y se normalizaron empleando tres genes de referencia, TBP, RPL13A y B2M, los cuales se habían validado previamente en cartílago de cadera humana [133]. La normalización según los genes de referencia y la determinación de los valores relativos de ARN se realizó empleando el programa qBase [134]. Los valores relativos de ARN de casos y controles se compararon con el método delta-delta-Ct. El análisis estadístico se hizo con el test de Mann-Whitney U y los coeficientes de correlación de rango de Spearman, empleando para ello el programa Statistica, versión 7.

3.6 Inmunohistoquímica

Se obtuvieron fragmentos de cartílago con hueso subcondral, según el procedimiento expuesto anteriormente. Tras fijar los fragmentos en formol al 10% y separar el cartílago del hueso, se deshidrataron e incluyeron en parafina. Se procedió a cortar los fragmentos en secciones perpendiculares a la superficie de 5 μm , las cuales se colocaron en portaobjetos, se extrajo la parafina, se rehidrataron y se tiñeron con hematoxilina, verde rápido FCF y safranina O. Las secciones contiguas también fueron sometidas a extracción de parafina y rehidratación, tras lo cual se incubaron con los anticuerpos monoclonales correspondientes en una cámara húmeda durante una noche a 20-22°C. Los anticuerpos que fueron seleccionados se muestran en la tabla 5. Fueron seleccionados debido a su baja reactividad cruzada. En concreto, los anticuerpos para las isoformas de TGF- β mostraron menos de un 2% de reactividad cruzada en ELISA (información facilitada por R&D Systems) y no pasaba del 6% en Western-blot [135].

Tras la hibridación del anticuerpo, las secciones fueron tratadas con peroxidase-blocking reagent (Dako, Glostrup, Denmark) durante 10 minutos para posteriormente incubarse durante 40 minutos con EnVision Detection Systems peroxidase/DAB, rabbit/mouse (Dako, Glostrup, Denmark) y finalmente tratarse durante 20 minutos con 3-3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido

(Dako, Glostrup, Denmark). Como control se procesaron secciones a las que no se les añadió anticuerpo primario.

Tabla 5. Anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica

Molécula	Casa comercial	Referencia
TGF- β 1	R&D Systems (Abingdon, UK)	MAB240
TGF- β 2	R&D Systems (Abingdon, UK)	MAB612
TGF- β 3	R&D Systems (Abingdon, UK)	MAB643
SMAD2 (86F7)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	#3122
SMAD3	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	#9513
P-SMAD2 (Ser465/467)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	#3108
P-SMAD3 (Ser423/425)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	#9520
PPM1A (p6c7)	Abcam (Cambridge, UK)	ab14824

Se empleó una escala semicuantitativa para determinar el número de condrocitos que mostraron reactividad y su localización (tabla 6). La intensidad de la tinción no se tuvo en consideración.

Tabla 6. Escala empleada para valorar la inmunorreactividad

Grado	Descripción
+	Condrocitos positivos aislados en zona I/II
++	Mayoría de condrocitos positivos en zona I/II
+++	Condrocitos positivos en zona III
++++	Condrocitos positivos en todas las zonas

3.7 Extracción de proteínas y Western-blot

Se procedió a triturar 400 mg de cartílago congelado con un mortero (Figura 8) manteniendo el frío con nitrógeno líquido. El polvo obtenido se introdujo en un buffer de lisis con inhibidores de proteasas elaborado de la siguiente manera: ortovanadato sódico 1 mM, 0.1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, cloruro sódico 250 mM, pirofosfato sódico 30 mM, EDTA 5 mM, fluoruro sódico 50 mM y cocktail de inhibidor de proteasas P8340 (Sigma, MO, USA) al 1%. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El método de Bradford

fue el empleado para cuantificar la cantidad de proteína obtenida [136].

Se cargó la misma cantidad de proteína para cada muestra en un gel al 10% de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. Tras la separación de las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (Millipore, MA, SUA) empleando una cubeta de transferencia Trans-Blot (Bio-Rad, CA, USA). Dichas membranas se incubaron con los anticuerpos primarios empleando las siguientes diluciones: antiSMAD2 1:10000, antiP-SMAD2 1:10000, antiSMAD3 1:10000, antiP-SMAD3 1:10000 y antiPPM1A 1:2000. Se usaron los mismos anticuerpos que para la inmunohistoquímica, ya referenciados en la tabla 5. Tras la hibridación se lavaron las membranas para eliminar el exceso de anticuerpo y se añadió el anticuerpo secundario. En función del anticuerpo primario se usó anti-ratón IgG-HRP: sc-2005 (Santa Cruz, TX, USA) o anti-conejo IgG 111-035-144 (Jackson, PA, USA). Para revelar la membrana se empleó el sustrato Immobilon quimioluminiscente de HRP (Millipore, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes de la membrana revelada se adquirieron con el sistema EC3 Darkroom (UVP, CA, USA) y se analizaron con el software de análisis de imagen ImageJ (NIH, MD, USA). Tras ello se eliminaron los anticuerpos de las membranas para

posteriormente hibridarlas con antiGAPDH (G9545 from Sigma, MO, USA), empleándose como control de carga.







4 RESULTADOS



RESULTADOS

4.1 Estudio de genes de referencia

Se extrajo ARN de un total de 8 rodillas artrósicas, 10 caderas artrósicas y otras 10 caderas que se utilizaron como control (Tabla 1). El ARN obtenido se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Todas las muestras empleadas tenían un ratio 260/280 superior a 1.90, lo que garantizó la calidad del ARN.

Para verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico se analizaron muestras en las que no se añadió transcriptasa inversa a la reacción. La contaminación de los reactivos se controló mediante reacciones en las que no se añadió muestra. En ambos casos, todos los controles resultaron negativos.

Se realizaron qPCR de diluciones seriadas de ARN para calcular la eficiencia de las PCR para cada set de primers con el programa LinRegPCR [132] (Figura 9). Cuando la eficiencia fue baja se optimizaron las condiciones de la PCR para aumentarla. En los casos en los que la eficiencia no mejoraba, se diseñaron nuevos primers hasta que las eficiencias de las PCR para todos los sets de primers fue superior al 95%.

Tras analizar los resultados de las qPCR de los genes de referencia seleccionados, se vio que abarcaban un amplio rango de expresión (el rango de los valores medios de los Ct iba de 18 a

36). Analizando las muestras de forma individual, se comprobó que mostraban una dispersión uniforme alrededor de la media sin apreciar sesgos marcados. Todas las muestras se analizaron por duplicado, obteniendo un coeficiente de variación (CV) de $1.08\% \pm 1.2$ desviaciones estándar (SD), o lo que es lo mismo, una muy baja variabilidad. Al estratificar los valores brutos por grupos de caderas artrósicas, rodillas artrósicas o caderas control se evidenciaron diferencias para HPRT1 y 18S RNA. Al ajustar los datos, corrigiéndolos por la eficiencia y relativizándolos con respecto a la mediana para cada gen de todas las muestras, el test de Mann-Whitney U demostró que 18S RNA presentaba un nivel de expresión significativamente más bajo en caderas y rodillas artrósicas respecto a caderas control ($p=0.03$). Esto podría indicar que el uso de 18S RNA como gen de referencia podría alterar los resultados si se empleara para normalizar los datos obtenidos al tratar de comparar los grupos de muestras ya mencionados.

Lo siguiente fue analizar los datos obtenidos con el programa geNorm, con el que se obtiene la medida de estabilidad de la expresión (M) para cada gen de referencia candidato, en base al ratio de variación de cada gen con respecto a todos los demás genes [127]. Se calcula el valor de M para cada gen y se procede a eliminar de forma consecutiva los genes con los valores más altos, cada vez que se elimina un gen se vuelven a calcular los valores de M. Se repite este proceso hasta quedarnos con la

pareja de genes más estable (Figura 10). Para este análisis se estudiaron las 28 muestras de forma conjunta, sin tener en cuenta el grupo del que procedían.

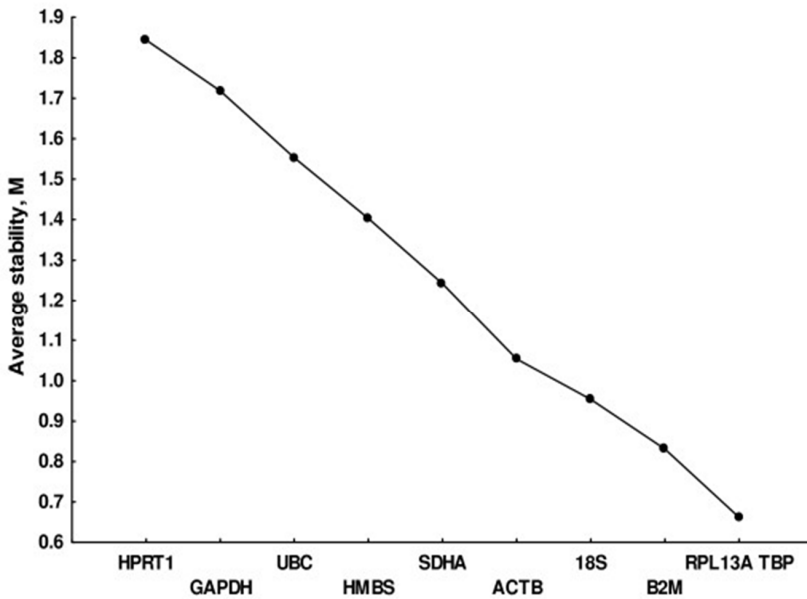


Figura 10. Medida de estabilidad de la expresión, M, de los genes de referencia candidatos calculada con geNorm

Como se puede apreciar en la figura 10, los genes más inestables fueron HPRT1 y GAPDH, mientras que los más estables fueron RPL13A y TBP.

Para realizar una correcta normalización es habitual tener que recurrir a varios genes de referencia. Para ello, geNorm nos ofrece una estimación del número óptimo de genes de referencia necesarios para obtener un factor de normalización adecuado.

Esto lo consigue mediante el cálculo del factor de normalización obtenido con la pareja de genes más estable y analizando los cambios que se producen en dicho factor al ir añadiendo sucesivamente los siguientes genes más estables. Estos cambios se cuantifican como V , la variación que se produce en el factor de normalización al añadir un gen. Una V elevada, indicaría que el gen que se añadió tendría un efecto significativo y debería ser incluido para realizar el cálculo del factor de normalización. El punto de corte establecido por geNorm fue decidido por los autores que lo desarrollaron[127]. De lo expuesto en la figura 11 se deduce que las variaciones para nuestro set de genes de referencia fueron bastante uniformes y que el número óptimo de genes necesarios para normalizar los resultados sería de tres genes (TBP, RPL13A, B2M).

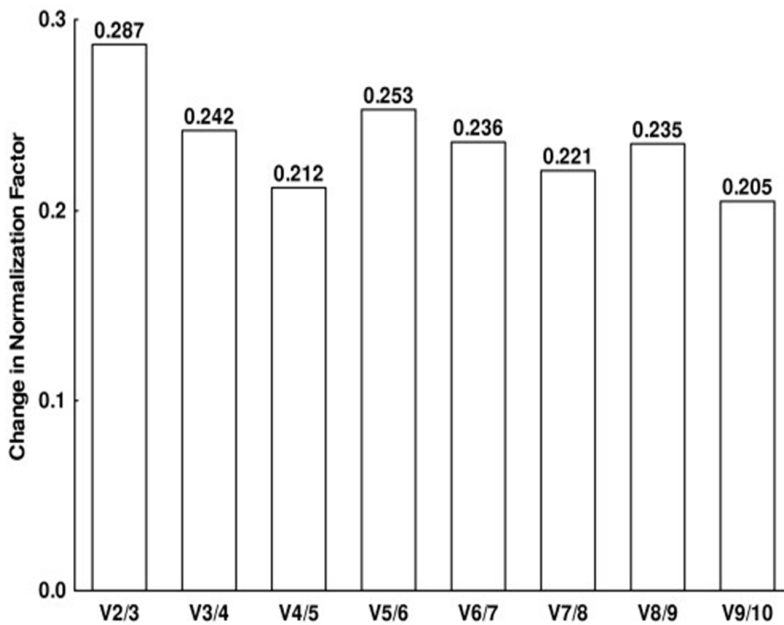


Figura 11. Evaluación del número óptimo de genes de referencia según geNorm

También se tuvo en consideración la posibilidad de que el sexo pudiera afectar la elección de los genes más estables se tuvo en consideración. Empleando geNorm por separado para hombres y mujeres, se obtuvo el mismo resultado, siendo los genes más estables TBP, RPL13A y B2M. Además, se utilizó geNorm habiendo excluido del análisis los genes que habían mostrado diferencias en la expresión entre los grupos de muestras, HPRT1 y 18S RNA, sin evidenciar tampoco diferencias.

Al contar con tres grupos diferentes de muestras, decidimos también emplear el programa NormFinder, el cual estima el valor

RESULTADOS

de estabilidad de los genes estratificando las muestras por grupos [129]. Esta aproximación combina la variación dentro de cada grupo y entre los distintos grupos para calcular el valor de estabilidad permitiendo establecer un ranking de los genes más estables (Tabla 7).

Tabla 7. Ranking de estabilidad de los genes de referencia según NormFinder

Ranking de estabilidad	Gen	Valor de estabilidad
1	RPL13A	0.24
2	TBP	0.28
3	B2M	0.30
4	UBC	0.32
5	ACTB	0.32
6	18S	0.38
7	SDHA	0.41
8	GAPD	0.42
9	HMBS	0.48
10	HPRT1	0.64
Mejor combinación	RPL13A+TBP	0.169

La mejor combinación de genes, teniendo esto en cuenta, resultó ser TBP y RPL13A, lo que concuerda con los resultados

obtenidos con geNorm. La misma concordancia se mantuvo al considerar los resultados para cada gen de forma individual. También se estudió la variación de los valores de estabilidad, teniendo en cuenta distintas agrupaciones clínicamente relevantes: caderas artrósicas versus caderas control, caderas artrósicas y rodillas artrósicas versus caderas control y caderas artrósicas versus rodillas artrósicas. En todas las comparaciones, los genes más estables fueron TBP, RPL13A, B2M, 18S RNA y ACTB, con el orden variando ligeramente en función de los grupos seleccionados (Figura 12).

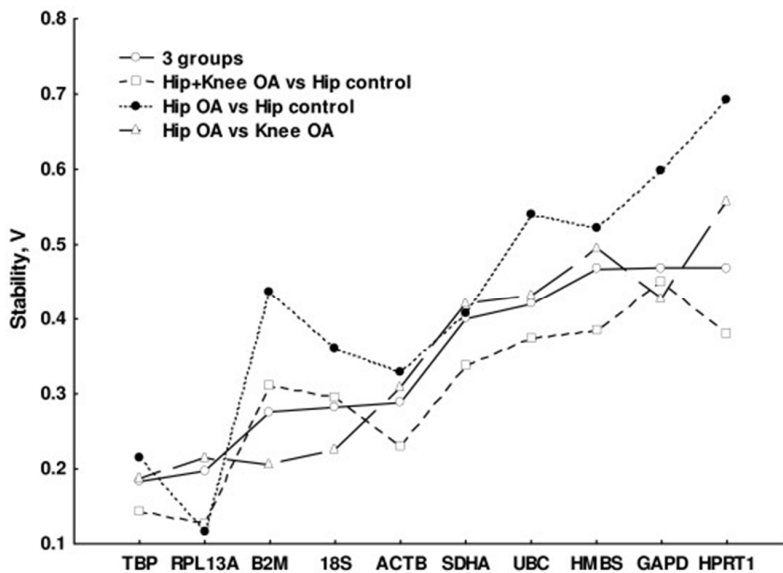


Figura 12. Estabilidad de los genes de referencia según la estratificación por grupos de acuerdo con NormFinder

4.2 Estudio de la ruta de TGF- β

4.2.1 Estudio de las isoformas de TGF- β

Se emplearon un total de 11 caderas artrósicas y 11 caderas control (Tabla 2). Se extrajo ARN de las muestras y se cuantificó el ARN con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Sólo se utilizaron las muestras con un ratio 260/280 superior a 1.90, asegurando la calidad del ARN empleado.

Se controló la contaminación por ADN genómico mediante la realización de transcripciones inversas a las que no se añadió transcriptasa inversa y la de los reactivos por medio de reacciones a las que no se añadió muestra de ARN. Todos los controles fueron negativos.

Para analizar la eficiencia de las PCRs se realizaron curvas de diluciones seriadas de ARN para cada set de primers y se calcularon las eficiencias con el programa LinRegPCR [132] (Figura 9). La eficiencia de las PCR para todos los sets de primers fue superior al 95%.

Se determinaron los niveles de COL2A1 y AGC1. COL2A1 mostró un incremento significativo de su expresión en cartílago artrósico con respecto al cartílago control ($p=0.0007$), mientras que AGC1 presentó una relación inversa, detectándose una disminución de la expresión en el cartílago artrósico ($p=0.002$) (Figura 13).

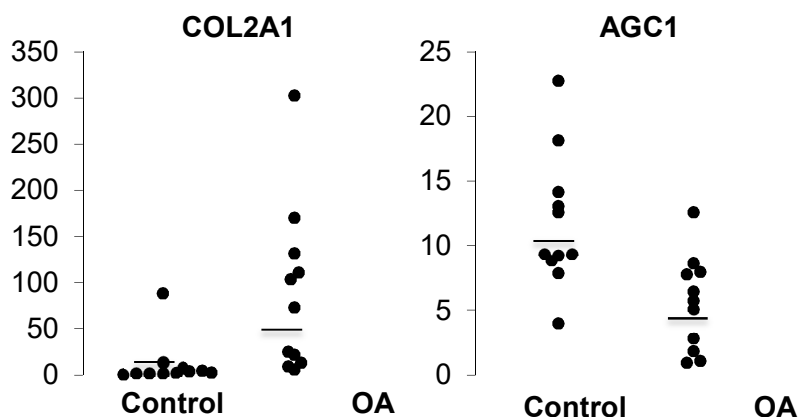


Figura 13. Niveles de expresión de COL2A1 yAGC1 en cartílago artrósico versus cartílago control. Las barras horizontales representan la media geométrica

El análisis de la expresión de ARN en todas las muestras de ambos grupos mostró que las tres isoformas de TGF- β estaban presentes. Los niveles de expresión resultaron ser significativamente más elevados en cartílago artrósico con respecto al cartílago control (Figura 14). TGF- β 3 resultó ser la isoforma que más incremento de la expresión presentaba, siendo 2.3 veces superior su expresión en cartílago artrósico frente al cartílago control ($p=0.009$). Las otras dos isoformas también presentaban niveles de expresión más elevados en cartílago artrósico. En el caso de TGF- β 2 nos encontramos con un aumento de 1.7 veces ($p=0.03$) y en el de TGF- β 3 con un incremento de 1.6 veces ($p=0.045$) en cartílago artrósico versus cartílago control.

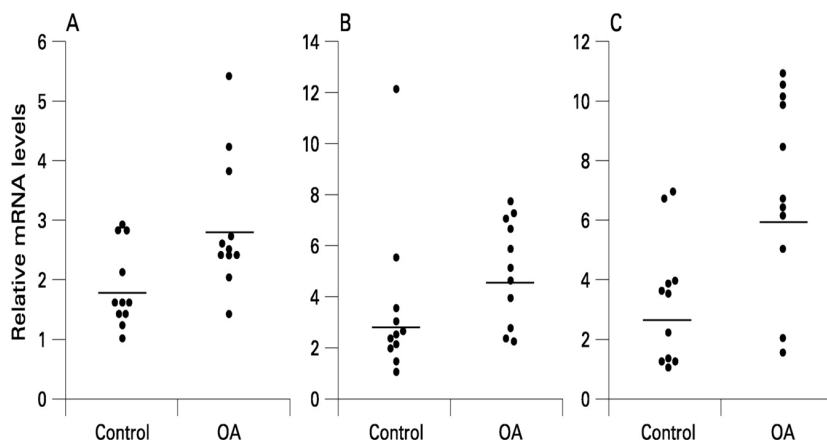


Figura 14. Comparación de los niveles de expresión, determinados por qPCR, de TGF-β1 (A), TGF-β2 (B) y TGF-β3 (C) en cartílago artrósico versus cartílago control. Las barras horizontales representan la media geométrica

El comportamiento similar de TGF-β1y TGF-β2, podría ser indicativo de la existencia de una correulación entre ambas moléculas. Consistente con esta idea, se comprobó que existía una fuerte correlación positiva entre los niveles de ambas isoformas en cartílago artrósico (Figura 15). En cartílago control no se encontró esta correlación. No se encontró correlación de los niveles de TGF-β3 con ninguna de las otras dos isoformas, tanto en cartílago artrósico como en cartílago control.

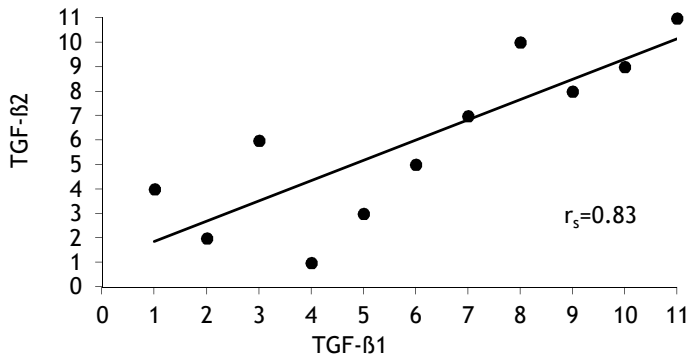


Figura 15. Correlación entre los niveles de expresión de TGF-β2 y TGF-β1 en cartílago artrósico

No se encontró correlación entre los niveles de expresión de COL2A1 y AGC1 con ninguna de las tres isoformas de TGF-β.

Los hallazgos de la inmunohistoquímica fueron concordantes con los resultados obtenidos con la qPCR (Figura 16).

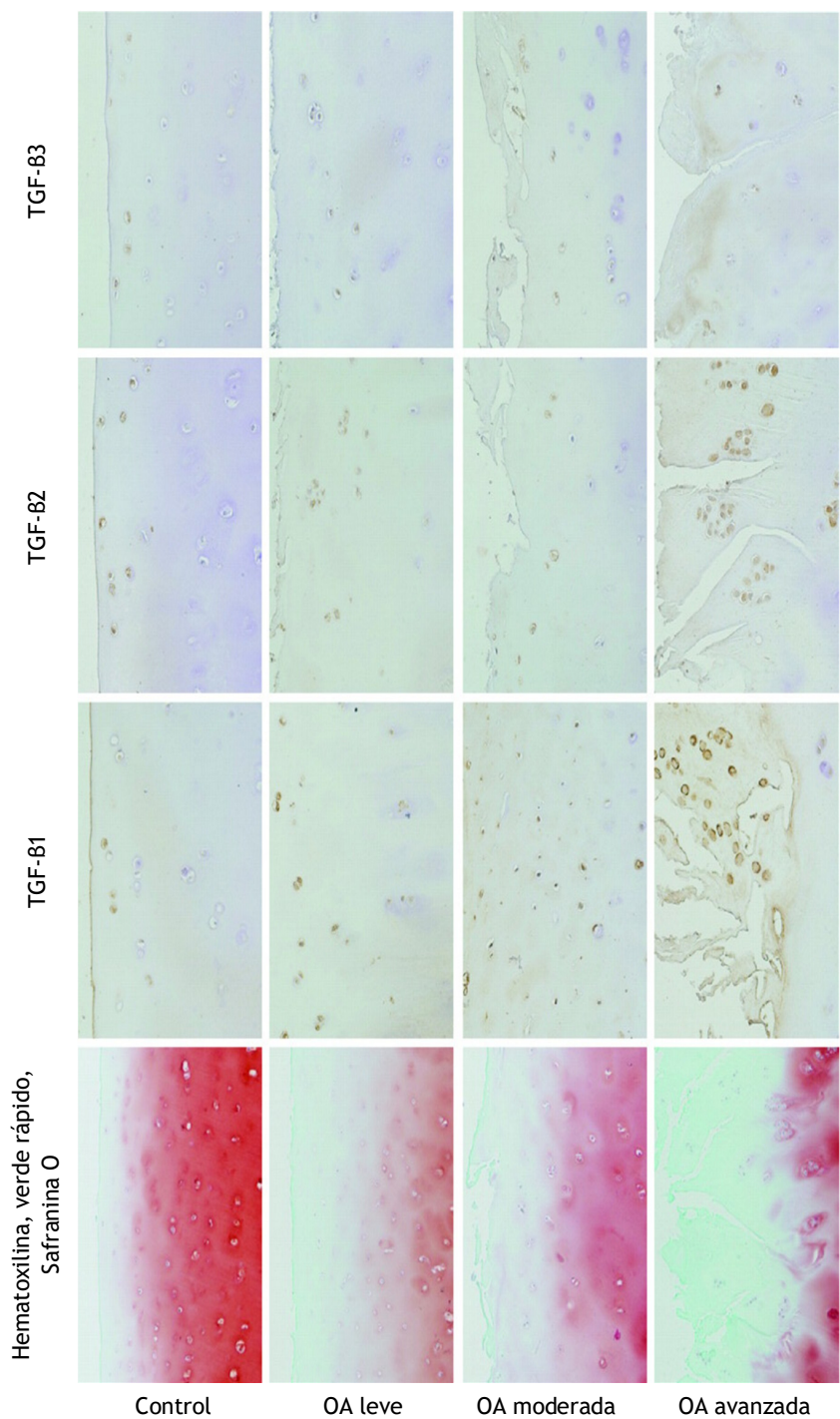


Figura 16. Inmunohistoquímica de las isoformas de TGF- β en función de la severidad de la OA. La superficie del cartílago está orientada hacia la parte superior de la figura. Aumento 10x para la tinción con hematoxilina y de 20x para la inmunohistoquímica de las isoformas

En el cartílago control se detectó la presencia de las tres isoformas sólo en una fracción de los condrocitos de las capas superficiales. En el cartílago artrósico se demostró que la expresión de las isoformas era más extensa. Se comprobó que este cambio era progresivo, en función del grado de severidad de la OA. Se evidenció un incremento en la proporción de condrocitos inmunorreactivos para las tres isoformas y también que estas células se encontraban en capas más profundas a medida que la enfermedad progresaba (Tabla 8). En las secciones de cartílago con un grado más avanzado de OA, se detectó inmunorreactividad en la mayoría de los condrocitos, incluso los ubicados en las capas más profundas.

Tabla 8. Extensión de la inmunorreactividad de las tres isoformas de TGF- β en función de la severidad de la OA

	TGF- β 1	TGF- β 2	TGF- β 3
Control	++	+	+
OA leve	++/+++	+ / ++	+
OA moderada	+++	++	++
OA avanzada	+++ / +++++	+++	++ / +++

RESULTADOS

Al comparar las tres isoformas entre sí, se vio que los condrocitos que captaban para TGF- β 1 eran ligeramente más abundantes. La tinción para TGF- β 2 y TGF- β 3 fue similar, si bien podría haber una mayor captación para TGF- β 2, al menos en algunos sujetos.

Todas las isoformas se detectaron en el citoplasma de los condrocitos. La matriz extracelular sólo mostró una captación difusa de baja intensidad (Figura 16).

Por último, se realizaron controles negativos, secciones a las que no se añadió anticuerpo primario para demostrar la especificidad de la tinción de TGF- β . (Figura 17). No se detectó captación alguna en dichos controles.

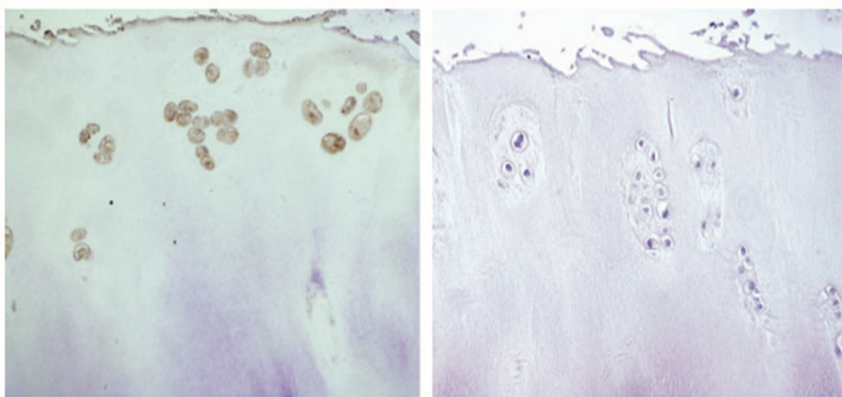


Figura 17. Ejemplo de control negativo. La figura de la izquierda muestra una sección teñida para TGF- β 1, mientras que la figura de la derecha muestra un control negativo incubado sin anticuerpo primario. Aumento 10x

4.2.2 Estudio de SMAD2, SMAD3 y PPM1A

Se utilizaron 11 caderas artrósicas y 11 caderas control (Tabla 2). Se procedió a extraer ARN de cada una de las piezas y se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Para asegurar la calidad del ARN, sólo se emplearon las muestras con un ratio 260/280 superior a 1.90.

Se realizaron controles para evitar la contaminación por ADN genómico y la de los reactivos. En todos los casos los controles resultaron negativos.

Se realizaron qPCRs de diluciones seriadas de ARN para calcular la eficiencia de las PCR para cada set de primers con el programa LinRegPCR [132] (Figura 9). La eficiencia de las PCR para todos los sets de primers fue superior al 95%.

Mediante qPCR se confirmó la presencia de PPM1A, tanto en cartílago artrósico como sano. La expresión de SMAD2 se vio aumentada de forma significativa en cartílago artrósico, en concreto 1.28 veces con respecto a cartílago control. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de PPM1A y SMAD3 entre cartílago artrósico y control (Figura 18). No se encontró correlación entre los niveles de expresión de ninguna de estas tres moléculas.

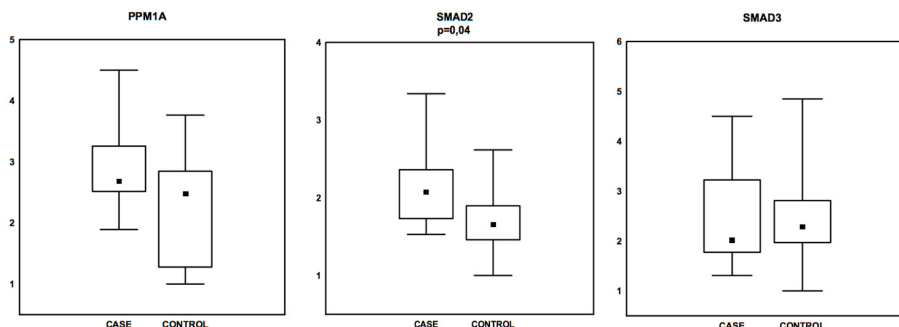


Figura 18. Comparación de los niveles de expresión, determinados por qPCR, de PPM1A, SMAD2 y SMAD3 en cartílago artrósico versus cartílago control

La inmunohistoquímica permitió diferenciar entre las formas fosforiladas y las no fosforiladas de los R-SMADs. Tanto en la forma no fosforilada de SMAD2 como en la de SMAD3, se detectó captación en capas profundas del cartílago artrósico al compararlo con el cartílago sano, sin embargo, sólo en el caso de las formas fosforiladas se detectó un incremento progresivo de la inmunorreactividad a medida que la OA progresaba. El comportamiento de PPM1A fue similar al de las formas no fosforiladas, sin llegar a evidenciar un claro incremento en la intensidad de la captación a medida que la OA avanzaba (Figura 19, tabla 9). La captación de todas las moléculas se detectó en el citoplasma de los condrocitos, apreciándose sólo una leve captación en la matriz extracelular.

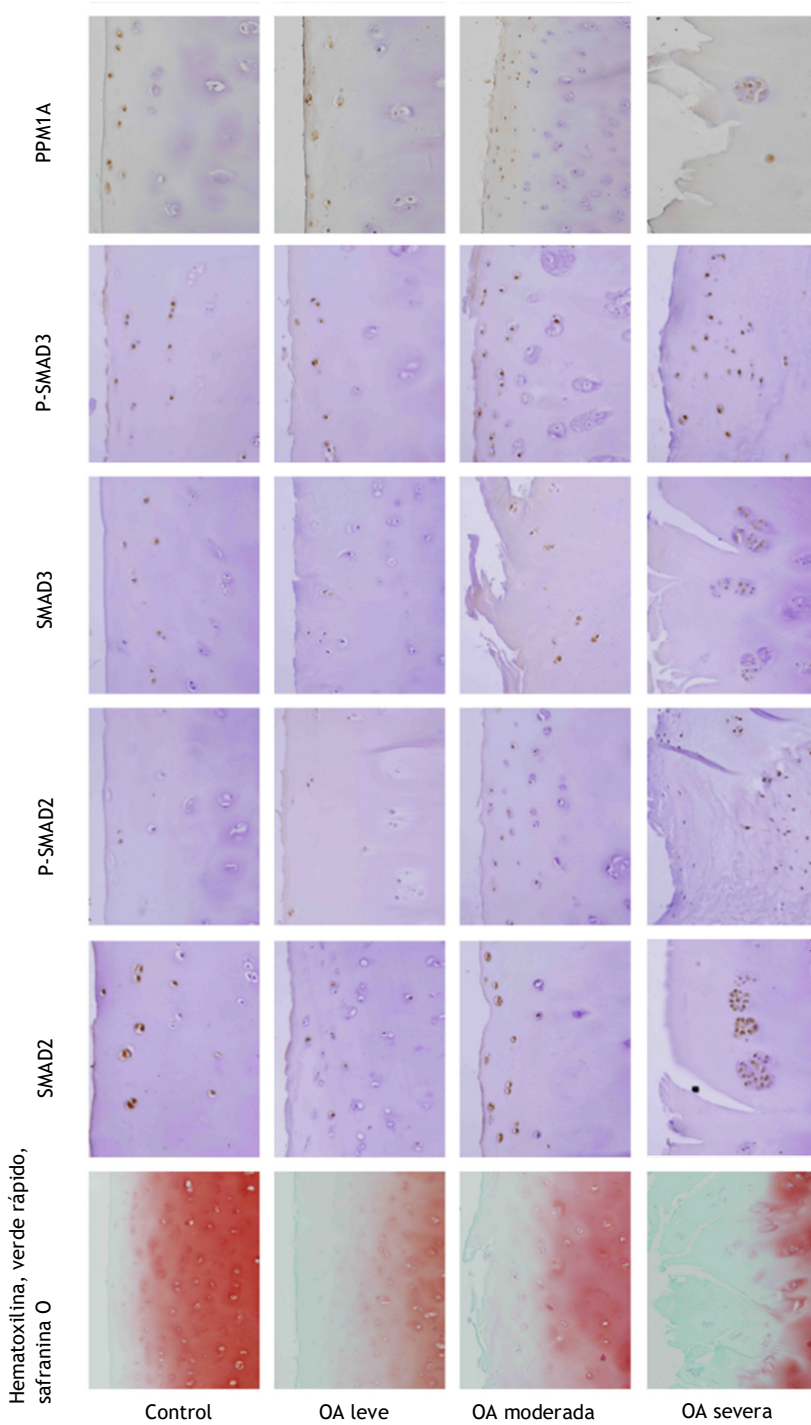


Figura 19. Inmunohistoquímica de SMAD2, SMAD3, P-SMAD2 y P-SMAD3 en función de la severidad de la OA. La superficie del cartilago está orientada hacia la parte superior de la figura. Aumento 10x para la tinción con hematoxilina y de 20x para la inmunohistoquímica de las isoformas

RESULTADOS

Tabla 9. Extensión de la inmunorreactividad de las formas no fosforiladas y fosforiladas de R-SMADs y de PPM1A en función de la severidad de la OA

	SMAD2	P-SMAD2	SMAD3	P-SMAD3	PPM1A
Control	+/++	+	+/++	+/++	+/++
OA leve	++	+	++	+/++	+/++
OA moderada	++/+++	+/++	++	++	++
OA avanzada	++	++/+++	++	++/+++	++

No se detectó captación en los controles negativos, secciones a las que no se añadió anticuerpo primario para demostrar la especificidad de la tinción.

Se realizó también un estudio preliminar de cuantificación de proteínas en los extractos de cartílago mediante Western-blot, con muestras de tres pacientes y de tres controles. Los resultados del Western-blot mostraron un incremento claro tanto de las formas no fosforiladas como de las fosforiladas en cartílago artrósico al compararlo con los controles. El Western-blot no detectó diferencias en los niveles de expresión de PPM1A (Figuras 20 y 21). Cabe destacar que el Western-blot nos permitió comprobar la especificidad de los anticuerpos ya que, a las diluciones utilizadas, no se observó ninguna reactividad cruzada entres las formas no fosforiladas y fosforiladas, tanto de SMAD2 como de SMAD3.

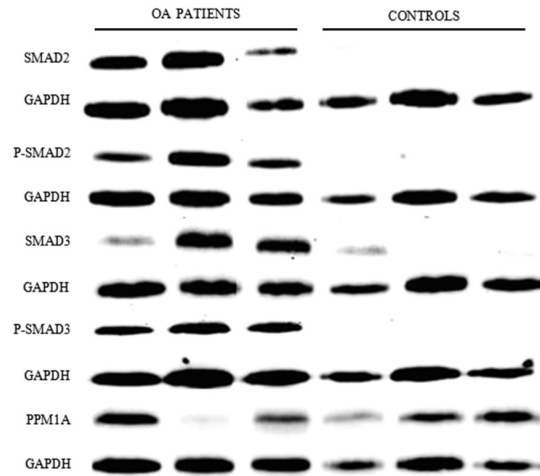


Figura 20. Western-blot de las formas no fosforiladas y fosforiladas de R-SMADs y de PPM1A. Se muestras tres casos y tres controles. GAPDH se empleó como control de carga

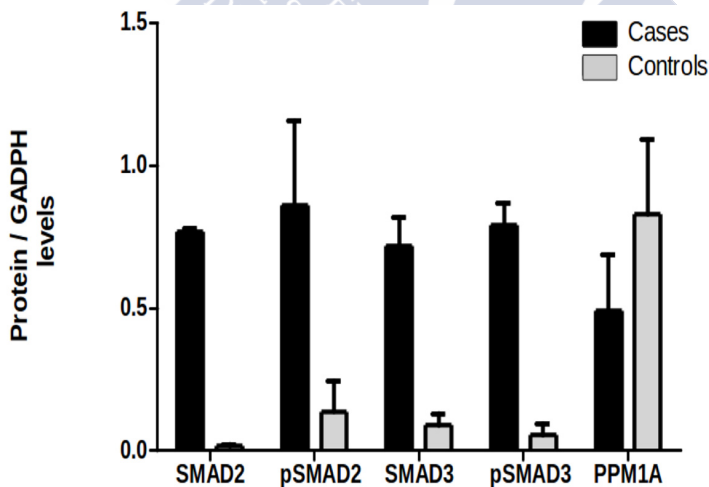


Figura 21. Comparación de los niveles de expresión determinados por Western-blot de las formas no fosforiladas y fosforiladas de R-SMADs y de PPM1A entre cartilago humano artrósico y control

4.2.3 Estudio de ALK1, ALK5 y TGFBR2

Se obtuvo ARN procedente de 11 cabezas femorales artrósicas y de 11 cabezas que se emplearon como controles (Tabla 2). Las muestras con un ratio 260/280 inferior a 1.90 fueron descartadas.

Al igual que lo descrito en apartados anteriores se realizaron controles para contaminación por ADN genómico y de los reactivos. Todos los controles fueron negativos.

Se comprobó la eficiencia de todos los sets de primers hasta obtener una eficiencia superior al 95% en todos ellos.

Se confirmó la presencia de ALK1, ALK5 y TGFBR2 en todas las muestras analizadas. El único receptor en el que se detectó un cambio significativo en la expresión en cartílago artrósico fue ALK5. En concreto se vio que la expresión de ALK5 estaba aumentada 1.44 veces en cartílago artrósico con respecto a control ($p=0.007$). Para los otros dos receptores, ALK1 y TGFBR2 no se evidenciaron diferencias significativas (Figura 22). No se encontró correlación entre los niveles de expresión de ninguna de estas tres moléculas.

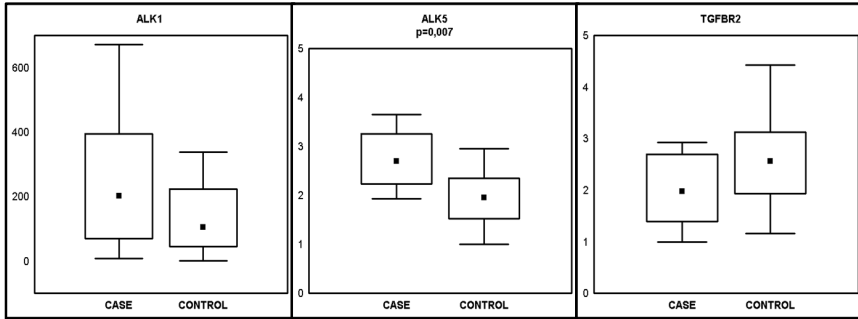


Figura 22. Comparación de los niveles de expresión, determinados por qPCR, de ALK1, ALK5 y TGFBR2 en cartílago artrósico versus cartílago control





5 DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Está demostrado que TGF- β es un potente inductor de la respuesta anabólica de los condrocitos y un poderoso antagonista del catabolismo del cartílago mediado por TNF- α e IL-1. Siendo TGF- β uno de los factores de crecimiento mejor estudiados, al mismo tiempo es uno de los más enigmáticos. Así, además de los efectos anabólicos mencionados, hay algunas evidencias de que podría jugar un papel como inductor del catabolismo que se produce en la OA. Por lo tanto, la evidencia sobre el papel de TGF- β en cartílago artrósico presenta contradicciones. A día de hoy hay numerosos trabajos sobre TGF- β en OA en cultivos de condrocitos y modelos animales pero escasean los trabajos realizados con cartílago humano.

Como un primer paso para subsanar esta deficiencia, se estableció una colección de muestras de cartílago humano artrósico y sano procedentes de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia de cadera.

Antes de iniciar los estudios de expresión sobre la ruta de TGF- β , se decidió realizar un trabajo en el que se optimizó la técnica de la qPCR. Para ello se seleccionó un pool de genes habitualmente utilizados para normalizar los resultados de la qPCR y se identificaron aquéllos que presentaron unos niveles de

expresión más estable en cartílago procedente de pacientes con OA y controles.

Tras ello, se procedió a determinar los niveles de expresión de diferentes moléculas implicadas en la ruta de TGF- β mediante distintas técnicas (RT-PCR, inmunohistoquímica, Western-blot), tratando de evidenciar cambios en la expresión de dichas moléculas en OA, pretendiendo dilucidar el papel de TGF- β en la etiopatogenia de la artrosis.

5.1 Estudio de genes de referencia

Lo primero a tener en cuenta al analizar los resultados es que los genes de referencia candidatos ya fueron seleccionados en estudios previos debido a su supuesta estabilidad en la expresión [123, 125, 127, 129], con lo que no cabría esperar grandes diferencias entre ellos. A la hora de escogerlos se tuvo en cuenta el hecho de que pertenecieran a diferentes familias funcionales, de tal forma que no estuvieran corregulados; con ello se logró que cada uno de ellos aportara información independiente y complementaria, lo que es una premisa fundamental a la hora de emplear geNorm.

Otra consideración importante es que se realizaron esfuerzos para tratar de minimizar cualquier fuente conocida de variación experimental. Para ello se recurrió a diferentes estrategias: se realizó una digestión con DNasa en todas las muestras, se

empleó la misma cantidad de ARN en cada reacción, la transcripción inversa y la PCR en dos pasos (RT-PCR) fueron efectuadas en dos pasos y además, se ajustaron los datos obtenidos según la eficiencia de las PCRs [117-119, 132, 137, 138].

La digestión por DNasa tuvo especial relevancia, ya que en el genoma hay una gran cantidad de pseudogenes insertados por retrotransposición. Muchos pseudogenes tienen secuencias similares a los genes pero sin intrones, por lo que serían amplificados en la PCR, aún a pesar de que los primers seleccionados se encontraran en exones diferentes [127]. Si no se eliminara completamente el ADN genómico sería imposible determinar si el producto de la amplificación es el adecuado o si ha habido contaminación por ADN genómico. Por lo tanto, la única forma de evitar amplificar estas secuencias es realizar la digestión por DNasa.

El realizar la RT-PCR en dos pasos permitió saber con certeza que la eficiencia de las transcripciones inversas para todos los genes era la misma para todos los genes. Además, de esta forma se evitó la aparición de primer-dimers, que está descrita cuando la reacción se realiza en un solo paso [157].

En cuanto a la eficiencia de las PCRs, se tuvieron que descartar varios sets de primers, teniendo que rediseñarlos, para obtener la eficiencia mínima requerida. Esto es importante destacarlo ya

que en la literatura hay muchos ejemplos en los que no se ha tenido en cuenta la eficiencia de los primers y en base a la experiencia descrita en este trabajo, esto podría dar lugar a resultados erróneos.

La selección sistemática de los mejores genes de referencia para normalizar los resultados de la qPCR se ha hecho de diferentes maneras en la literatura. Todos los métodos tratan de determinar la estabilidad de la expresión de estos genes, bien por la ausencia de diferencias en la expresión entre grupos clínicamente relevantes [125], bien por la estabilidad relativa en relación a otros genes de referencia [127, 139] o en relación a grupos clínicamente significativos [129]. El uso de estos métodos se ha visto favorecido por la gratuidad de los programas y por la descripción de sus principios y metodología [127, 129, 139]. No hay ninguna razón definitiva para preferir un método sobre los demás ya que su idoneidad depende de las circunstancias. En el trabajo presente se seleccionaron tres de lo más consolidados: un test estadístico convencional que compara grupos clínicamente relevantes y los programas geNorm y NormFinder. Los resultados de los tres métodos fueron en líneas generales muy similares, aunque el análisis estadístico no aportó tanta información como los programas empleados. La semejanza de los resultados entre los tres métodos refuerza las conclusiones obtenidas en este trabajo.

Un hallazgo muy llamativo fue que algunos de los genes más comúnmente empleados como genes de referencia presentaron unos pobres resultados. Una mención especial merece GAPDH, que no estuvo entre los mejores genes de referencia en ninguno de los análisis realizados en este trabajo. Sin embargo, GAPDH es uno de los genes de referencia más usados en investigación [121] y ha resultado ser uno de los mejores genes de referencia en muchos tejidos [127]. También hay numerosos ejemplos en los que el empleo de este gen ha proporcionado resultados erróneos a causa de su falta de estabilidad en determinadas condiciones experimentales [121].

Otros dos genes de referencia habitualmente utilizados, ACTB y 18 S RNA [121], obtuvieron mejores resultados aunque tampoco se encontraron entre los mejores. Estos hallazgos confirman la necesidad de seleccionar los genes de referencia adecuados para cada experimento. Como ejemplo relevante se puede destacar el contraste entre los resultados de este trabajo y los obtenidos en un estudio centrado en cáncer de próstata, en el que HPRT1 demostró ser el gen más estable y RPL13A y ACTB los más inestables [125]. Estos resultados son inversos a los aquí observados, siendo HPRT1 el gen más inestable y RPL13A uno de los genes más estables.

Los mejores genes de referencia detectados en este estudio resultaron estar entre los menos utilizados habitualmente: TBP, RPL13A y B2M. Para optimizar los resultados se debería utilizar

una combinación de dos o tres genes de referencia [127, 129]. Lo que proponemos en base a nuestros resultados, es que para estudios generales de cartílago en pacientes de edad avanzada, el uso de la combinación de TBP y RPL13A podría ser un buen punto de partida, pudiendo plantearse la inclusión de B2M.

Revisando la bibliografía nos encontramos con varios estudios en los que se han buscado los genes de referencia más estables para su uso en cultivos de condrocitos y en cartílago en diferentes contextos (Tabla 10). En estos trabajos se emplearon los mismos programas informáticos mencionados con anterioridad, geNorm y NormFinder. Revisando los resultados, llama la atención la concordancia con los hallazgos aquí expuestos. Es muy relevante el hecho de que entre los genes más inestables en todos los escenarios, se encuentran genes que se utilizan como genes de referencia en muchos estudios, incluso en el campo de la OA. De todos modos, también hay alguna discrepancia puntual, como el hecho de que RPL13A sea uno de los genes más inestables en los platillos vertebrales, siendo uno de los más estables en nuestro estudio y en los otros dos trabajos de la tabla 10. Esto se puede justificar por diferencias entre los platillos vertebrales y el cartílago articular, lo que reafirma la necesidad de evaluar los genes de referencia en cada tejido y para cada condición experimental.

Tabla 10. Estudios que han identificado los genes de referencia más estables en tejidos de relevancia en la OA

Estudio	Tejido	Genes más estables	Genes más inestables
Foldager et al [160]	Cultivo de condrocitos	RPL13A, B2M, RPII	ACTB, GAPDH
Studer et al [161]	Células mesenquimales	RPL13A	ACTB, GAPDH
Zhou et al [162]	Platillos vertebrales	SDHA, B2M, LDHA	18S, ACTB, GAPDH, RPL13A

A día de hoy, varios trabajos han tenido en cuenta los resultados aquí expuestos para seleccionar los genes de referencia empleados para normalizar sus resultados [95, 163-168], si bien en la mayoría de ellos optaron por emplear sólo un gen de referencia.

Finalmente, hay que tener en cuenta algunas limitaciones del presente trabajo. Primero, el número de genes evaluados fue limitado. Se han propuesto otros genes para su uso en qPCR y es posible que algunos de ellos sean una mejor alternativa que los aquí propuestos. Los estudios de microarray en cartílago, los cuales empiezan a publicarse [114, 116, 140], podrían proporcionar pistas para la identificación de genes candidatos. Segundo, los resultados obtenidos en este trabajo sólo se pueden aplicar en estudios de cartílago humano centrados en OA de

grandes articulaciones. En concreto, las muestras empleadas procedían de pacientes de edad avanzada. Por lo tanto no se pueden extrapolar con certeza estos hallazgos a la hora de realizar estudios en otras articulaciones y/o pacientes de distinto rango de edad. Tampoco está claro hasta qué punto se pueden aplicar los resultados obtenidos con SYBR® Green a otras técnicas de qPCR.

A pesar de ello, lo aquí expuesto puede servir como una guía para cualquier otro trabajo que se vaya a realizar con cartílago en el que se podrían seleccionar los genes de referencia una vez se hubiera comprobado su estabilidad.

5.2 Estudio de la ruta de TGF- β

5.2.1 Estudio de las isoformas de TGF- β

Hay un gran número de estudios *in vitro* y en modelos animales que han demostrado la gran relevancia que tiene TGF- β en el desarrollo de la OA, pero la información procedente de cartílago humano es escasa. En este trabajo se procedió a cuantificar los niveles de expresión de TGF- β a nivel de ARNm y a nivel proteico en cartílago procedente de pacientes con OA de cadera y controles.

Al realizar estudios cuantitativos de niveles de expresión hay que tener mucho cuidado con los detalles técnicos. Se ha empleado la combinación de tres genes de referencia para normalizar los

resultados obtenidos con la qPCR. Los genes seleccionados fueron TBP, RPL13A y B2M, los genes de referencia identificados en el trabajo expuesto en el apartado anterior, como más estables en cartílago humano artrósico y control procedente de pacientes de edad avanzada [133]. Estas características se corresponden con el perfil de los casos y controles utilizados en el estudio de la ruta de TGF- β . Además, se ha tenido en cuenta la eficiencia de las PCRs, empleando sólo aquellos sets de primers que demostraron una eficiencia superior al 95%.

Se observó un aumento significativo de la expresión de las tres isoformas de TGF- β en cartílago procedente de caderas artrósicas al compararlo con control. Las diferencias fueron en torno al 50% de incremento para TGF- β 1 y TGF- β 2 y algo más del doble en el caso de TGF- β 3. Estos cambios probablemente se corresponden con el mayor porcentaje de condrocitos que mostraron inmunorreactividad para las tres isoformas de TGF- β en los estudios histológicos de cartílago artrósico. Esta positividad se trasladó a capas más profundas en aquellas muestras que mostraron daño severo en las capas superficiales. Por lo tanto, se puede deducir que el aumento de la expresión de las isoformas de TGF- β determinado con la qPCR se debe a que hay un mayor porcentaje de células que expresan TGF- β tanto en capas superficiales como profundas.

Una posible limitación a tener en cuenta es que algunas de las muestras empleadas como controles podrían pertenecer a

pacientes con osteoporosis ya que fueron obtenidas de sujetos sometidos a artroplastia por fractura de cadera. Si bien, los niveles de TGF- β en sangre y en hueso de pacientes con osteoporosis se han descrito como estables o incluso incrementados [141, 142]. Por lo tanto, el incremento que se ve en cartílago artrósico parece no estar relacionado con este hecho.

El incremento detectado en cartílago de los niveles de TGF- β hasta fases avanzadas de OA es consistente con el papel propuesto de TGF- β como inductor de la respuesta anabólica e inhibidor del catabolismo inducido por el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) e interleuquina-1 (IL-1) [84, 87]. Este mismo resultado va en contra de la hipótesis de que TGF- β disminuye a medida que la OA progresa y que este descenso contribuye a la aparición de lesiones en cartílago. Esta teoría se desarrolló en base a resultados obtenidos a partir de dos modelos murinos de OA, en los cuales se vio que la expresión de TGF- β prácticamente desaparecía antes de la aparición de erosiones en el cartílago [143]. En contraposición, otro modelo de ratón mostró un incremento persistente en la expresión de TGF- β con un mayor aumento de la isoforma TGF- β 3 [88]. Los estudios en cartílago humano artrósico son escasos y no concluyentes pero en su mayoría apuntan a un aumento de expresión como el observado en el presente estudio. Un trabajo, en el que se empleó inmunohistoquímica, detectó una ligera disminución en la captación de TGF- β 1 sin llegar a evidenciar cambios en las

otras dos isoformas [94]. Sin embargo, en otro estudio se vio que había un aumento en la expresión de ARNm de TGF- β 1 y TGF- β 3 en cartílago artrósico, si bien para llegar a estos resultados sólo se compararon muestras procedentes de seis pacientes artrósicos con dos controles [92]. Más recientemente, mediante qPCR, se observó un incremento de los niveles de TGF- β 1 en muestras de cartílago de 32 pacientes con OA (25 caderas y 7 rodillas) comparadas con 21 controles [96]. En este último trabajo no se estudiaron las otras dos isoformas. Por su parte, dos análisis proteómicos han comunicado una elevación de TGF- β 1 y un aumento de TGF- β 2, respectivamente [93, 169]. Por último, en un microarray realizado con muestras procedentes de biopsias de cartílago humano artrósico se determinó una elevación de TGF- β 1 en OA [170].

El incremento sostenido en la expresión de las tres isoformas de TGF- β que se describe en este trabajo indica la persistencia de señales estimuladoras durante la progresión de la OA y que los condrocitos son capaces de seguir respondiendo a estas señales. Esto se hace especialmente evidente al tener en cuenta que el aumento de la expresión de TGF- β va acompañado de una proliferación clonal de los condrocitos y que éstos son capaces de producir TGF- β en capas profundas, lo cual no se ve en cartílago control.

De todos modos, el hecho de que TGF- β se encuentre aumentado en cartílago artrósico no implica que sea efectivo a la

hora de protegerlo. La evidencia en este sentido es contradictoria [94, 114, 116, 143, 144]. Hay estudios que demostraron una reducción en los niveles de TGF- β R en artrosis [94, 144] y otros en los que se determinó que existía un descenso en la señalización de la ruta de TGF- β [143]. Otra posibilidad sería que TGF- β estuviera ejerciendo su efecto a través de una ruta alternativa. Así, en un modelo de ratón se ha descrito que la vía canónica de señalización de TGF- β por medio de ALK5, estaría desplazada a favor de la señalización por ALK1 [107]. En el mismo trabajo se vio que los niveles de ALK1 en cartílago humano, estarían correlacionados con los de MMP13, mientras que los de ALK5 lo estarían con los de agregano y colágeno tipo 2 [107]. En un trabajo realizado con cultivos de condrocitos se vio que ALK1 inhibía la síntesis de fibronectina y colágeno tipo II, mientras que ALK5 la estimulaba [108]. Por lo tanto, hay resultados que apuntan a una disminución de la señalización por la ruta de TGF- β y otros que sugieren una desviación de la ruta canónica. Según la evidencia disponible, esta desviación iría a favor de que TGF- β podría ser un inductor del daño en la OA.

Con todo, los datos obtenidos hasta aquí en el presente trabajo, indican que la pérdida de ECM en la OA no tiene que ver con una disminución de la expresión de TGF- β . No está claro si la falta de sensibilidad a TGF- β podría ser un factor determinante en el desarrollo de la OA o incluso si TGF- β ha perdido su efecto protector en cartílago para convertirse en un factor nocivo

a medida que la OA progresa. Recientemente se ha descrito en cartílago humano artrósico, que la expresión de MMP13 estaría asociada con un aumento de la expresión de TGF- β 1 [96], lo que iría a favor de que TGF- β está ejerciendo un papel negativo en el desarrollo de la OA. En otro trabajo, sobre un modelo de ratón con OA, vieron que la expresión de TGF- β 1 en hueso subcondral inducía la aparición de daño artrósico, mientras que su inhibición disminuía la degeneración del cartílago articular [171].

Las tres isoformas de TGF- β presentan una considerable pero incompleta similitud en su secuencia de aminoácidos que estaría en torno a un 70-80% [59]. Hay múltiples ejemplos que demuestran expresiones diferentes para cada isoforma. Esto puede deberse a la falta de homología de las regiones promotoras de los tres genes lo que haría que estuvieran sometidos a distintos mecanismos reguladores [59, 158, 159]. También se ha descrito que las tres isoformas tienen actividades superpuestas pero no idénticas en múltiples entornos [145-151].

El incremento más marcado de TGF- β 3 en cartílago artrósico y el hecho de que no esté correlacionado con el aumento de TGF- β 1 y TGF- β 2, indicarían que TGF- β 3 está sometido a mecanismos reguladores distintos a los que actúan sobre las otras dos isoformas. La posibilidad de que las isoformas de TGF- β tengan distintos efectos nunca se ha estudiado en cartílago con lo que resulta imposible predecir la relevancia que tiene la diferente

regulación de TGF- β 3 con respecto a TGF- β 1 y TGF- β 2 en OA. Estos resultados también sugieren que estudiar sólo TGF- β 1 para definir el papel de TGF- β en OA podría llevar a obtener resultados inexactos.

En este estudio se incluyó un análisis de COL2A1 y AGC1 con la intención de poder evaluar la respuesta anabólica del condrocito y su posible relación con los niveles de TGF- β .

Se vio que había una disminución en la expresión del gen AGC1 en cartílago artrósico. La depleción de agregano en cartílago artrósico es uno de los fenómenos más precoces y conocidos desde hace tiempo como parte de la pérdida de proteoglicanos. Esta reducción podría deberse en parte a una reducción en la expresión del gen, pero además se sabe que se produce un aumento en la degradación del agregano por agreganasas y metaloproteasas de matriz. La disminución de la expresión del gen de AGC1 aquí descrita, contrasta con lo observado en modelos experimentales de OA precoz, en los que se describió un aumento en la expresión de AGC1 [152, 153]. Esta divergencia puede deberse a que las muestras que se utilizaron en nuestro estudio procedían de pacientes sometidos a recambio articular por OA avanzada. Por otra parte, los microarrays de expresión realizados en cartílago humano procedente de pacientes con OA avanzada, no han identificado cambios en la expresión de AGC1 [170, 172, 173]. Por lo tanto, es posible que nuestro experimento haya detectado una diferencia demasiado

pequeña para que se observe de forma reproducible. No es posible en este momento mantener que exista un cambio indiscutible en el nivel de expresión de este gen.

Al contrario que en el caso de AGC1, se detectó un incremento significativo de la expresión de COL2A1 en cartílago artrósico. Este hallazgo sería consistente con lo ya descrito previamente [154] y con los hallazgos de múltiples estudios de expresión con microarrays [170, 172, 173].

El aumento de la expresión de COL2A1 sería un reflejo de la respuesta de reparación del cartílago. Sin embargo, no se observa un aumento similar de AGC1, lo que es sugestivo de que a medida que la OA avanza, se produce un intento fallido de la remodelación del cartílago, existiendo un desequilibrio en la producción de los componentes de la matriz, más que una síntesis insuficiente de todos sus componentes.

No se vio una correlación entre los niveles de COL2A1 y AGC1 con los de las isoformas de TGF- β . Es difícil poder interpretar este resultado, debido a la gran complejidad de la regulación postranscripcional de la vía de TGF- β , por lo que la falta de una relación directa entre los niveles de las isoformas de TGF- β y los de COL2A1 y AGC1 puede deberse a múltiples factores.

5.2.2 Estudio de SMAD2, SMAD3 y PPM1A

En base a lo expuesto en el apartado anterior, asumimos que hay un aumento de la expresión de TGF- β en cartílago artrósico. Como paso adicional nos propusimos investigar si este incremento de TGF- β se traduciría en un aumento de la señalización por la vía canónica, o lo que es lo mismo, si había un aumento de la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 en cartílago artrósico. Además, se estudió la expresión de PPM1A en cartílago artrósico, una fosfatasa capaz de interferir en la fosforilación de SMAD2 y SMAD3.

A la hora de realizar las qPCR, se tuvieron en cuenta las mismas premisas que en el estudio de las isoformas de TGF- β . Todas las PCRs presentaron una eficiencia superior al 95% y además, se ajustaron los resultados de las qPCR con los tres genes de referencia, TBP, RPL13A y B2M, que fueron identificados en el trabajo inicial como los más estables en cartílago procedente de sujetos de edad avanzada [133].

La qPCR evidenció un incremento significativo de la expresión de SMAD2 en cartílago artrósico, mientras que no se detectaron diferencias en la expresión de SMAD3.

A nivel proteico, el estudio más completo fue el inmunohistoquímico, que no mostró ningún cambio relevante en la extensión de la expresión de SMAD2 y SMAD3. Los dos factores de transcripción estuvieron limitados a una fracción de

los condrocitos de las capas superficiales del cartílago. Sin embargo, se observó un aumento moderado de P-SMAD2 y en menor medida de P-SMAD3. El análisis de western-blot ha sido muy limitado y sus resultados sólo pueden considerarse en cuanto no contradicen los hallazgos observados con las otras técnicas.

En un estudio anterior se ha descrito un aumento de la expresión de ARNm de SMAD3 en cartílago humano artrósico [96]. La discrepancia con los hallazgos aquí expuestos podría deberse a que en dicho trabajo se empleó GAPDH como gen de referencia para normalizar los resultados de la qPCR. Como se ha descrito en el apartado anterior y se ha corroborado por otros autores, GAPDH no es un buen gen de referencia en cartílago humano artrósico [133, 160-162]. Por otra parte, los microarrays de expresión no han demostrado cambios en la expresión de estos factores de transcripción a nivel de ARNm [170, 172, 173]. Esto resultados son compatibles con los resultados de la qPCR e inmunohistoquímica aquí expuestos: ausencia de cambios o ligeros cambios en la expresión de SMAD2 y SMAD3. De hecho, el aumento de la expresión de SMAD2 observado en la qPCR fue sólo de 1.28 veces, lo que está claramente por debajo del umbral de 2 veces, normalmente utilizado en los estudios de microarrays. Este resultado también es coherente con lo que se sabe de la regulación de SMAD2 y SMAD3, que tiene lugar

principalmente a nivel de fosforilación y translocación al núcleo, y no a nivel de transcripción [174].

Los hallazgos del Western-blot son discordantes a este respecto pues parecen indicar que hay un aumento de la cantidad de proteína, tanto sin fosforilar como fosforilada. Aunque es posible que la proteína esté aumentada sin cambios detectables a nivel de ARNm, esto parece incompatible con los resultados de la inmunohistoquímica. Por lo tanto, se debe considerar que los resultados del Western-blot lo único que muestran es que no hay una disminución de P-SMAD2 y P-SMAD3, que es el resultado que se debería esperar si hubiese un defecto de señalización por la ruta canónica de TGF- β . El análisis de un mayor número de muestras permitirá definir si los otros resultados de Western-blot se mantienen o no.

Por desgracia, la falta de un soporte suficiente del Western-blot nos deja sólo con la inmunohistoquímica para valorar los cambios en las formas fosforiladas de SMAD2 y SMAD3 en cartílago artrósico. Estos cambios son modestos, pero sugieren que el aumento de la expresión de las isoformas de TGF- β relatado en el apartado anterior [95], es efectivo a la hora de ejercer su señalización por la vía canónica. En definitiva, el aumento de TGF- β en cartílago artrósico conlleva que SMAD2 y SMAD3 sean fosforilados. Esta consecuencia no es irrelevante, pues TGF- β se regula a múltiples niveles postranscripcionales y, por lo tanto, un aumento a nivel de ARNm no se traduciría

automáticamente en un aumento de la señal. Además, se ha propuesto que otros pasos de la ruta se verían afectados en la OA, lo que interferiría con la transmisión de la señal de TGF- β . En concreto se ha descrito una disminución de los niveles de TGF- β R2 en cartílago humano artrósico [94, 144]. Por lo tanto, el aumento de las formas fosforiladas de SMAD2 y SMAD3 es muy importante pues muestra que la ruta canónica de TGF- β está hiperactiva en la OA.

Podríamos interpretar la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 como un mecanismo compensatorio a medida que la OA progresa, representando un esfuerzo por parte del condrocito que intenta evitar su diferenciación terminal. Sin embargo, también es posible que el incremento en la actividad de la ruta de TGF- β tuviera un efecto deletéreo en el cartílago artrósico, tal como se ha sugerido en algunos estudios previos [88, 105]. En esta línea, se ha visto que TGF- β aumenta la expresión de MMP13 en cultivos de condrocitos [99] y, como ya se comentó previamente, se determinó una asociación entre los niveles de MMP13 y el incremento en la expresión de TGF- β 1 en cartílago humano artrósico [96]. En ese mismo estudio se sugirió que la activación de MMP13 por TGF- β 1 se establece a través de una vía alternativa a la de SMAD2 y SMAD3. Esta hipótesis ya se ha planteado con anterioridad como una de las que tratan de explicar el desarrollo de la OA. Según esta teoría, TGF- β dejaría de señalar a través de ALK5 hacia SMAD2 y SMAD3 a favor

de la señalización a través de ALK1 hacia SMAD1/5/8. Este cambio iría asociado a un aumento de la expresión de MMP13 y, por ende, se produciría la diferenciación terminal del condrocito [107, 155]. Sin embargo, esa ruta alternativa no sería la única explicación posible de la relación entre TGF- β y MMP13. En efecto, TGF- β también podría ejercer su efecto a través de otra ruta, mediante una proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), la cual se ha relacionado con los niveles de MMP13. En esta ruta dependiente de MAPK tendría que haber una coactivación de los R-SMADs para que la estimulación de MMP13 fuera efectiva [101]. Nuestros resultados no han analizado de forma suficiente los efectos de TGF- β en el cartílago como para informar sobre el efecto final, beneficioso o deletéreo de TGF- β en la OA. Lo que ya nos permiten los resultados discutidos hasta aquí, es desmentir la parte de la hipótesis en la que se argumenta que TGF- β ejerce un papel nocivo al haber una disminución de la señalización por la ruta canónica de TGF- β .

En este trabajo también se estudió la expresión de PPM1A en cartílago humano. PPM1A ejerce un efecto inhibitor en la señalización de TGF- β mediante la defosforilación de los R-SMADs [75]. Partimos de la base de que PPM1A podría estar jugando un papel en la patogenia de la OA, mediante la finalización de la señal inducida por TGF- β . Se vio que PPM1A estaba presente en cartílago artrósico y control, pero no se

apreciaron diferencias en los niveles de expresión de PPM1A en la OA. Recientemente se ha descrito un aumento de la expresión de PPM1A en tejido sinovial procedente de pacientes con espondilitis anquilosante, habiendo empleado tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y OA como controles. En este estudio no se evidenciaron diferencias en los niveles de expresión de PPM1A en los controles [156], lo que confirma nuestros hallazgos. Por lo tanto, no parece que cambios en la expresión de PPM1A en cartílago estén desempeñando un papel relevante en la OA.

5.2.3 Estudio de ALK1, ALK5 y TGFBR2

Por último, se ha analizado la expresión a nivel de ARNm de unos protagonistas fundamentales en la ruta de TGF- β que son los receptores. Se han descrito cambios en los niveles de expresión de TGFBR2 en OA, sobre todo en modelos animales, con escaso soporte en estudios en humanos [94, 144, 175]. Además, como ya se ha expuesto en este trabajo, hay una teoría que se basa en que TGF- β dejaría de señalizar por la vía canónica, ALK5, a favor de una ruta alternativa a través de ALK1 que conllevaría la aparición de daño en el cartílago [107, 108]. Esta hipótesis se basa sobre todo en resultados obtenidos en ratones. La evidencia en cartílago humano en este sentido es escasa, aunque se vio que en cartílago humano artrósico había una correlación entre los niveles de ALK1 y MMP13 y entre los niveles de ALK5 y agregano y colágeno tipo II, esta es una

evidencia muy indirecta que no se puede considerar como causal. Además, no se compararon los niveles de expresión de estos receptores con los de cartílago control [107]. Fue precisamente eso lo que nos propusimos hacer en este apartado.

Al igual que en los apartados anteriores se optimizaron las PCRs de tal forma que todas tuvieron una eficiencia por encima del 95% y se normalizaron los resultados de las qPCR con los tres genes de referencia identificados como más estables en cartílago procedente de sujetos de edad avanzada, TBP, RPL13A y B2M [133].

Sólo ALK5 demostró un incremento significativo en cartílago artrósico, mientras que no se detectaron diferencias en ALK1 y TGFBR2. No se detectó correlación entre los niveles de expresión de estas tres moléculas.

Al revisar la literatura, la evidencia es muy escasa, pero apunta a que hay un descenso en la expresión de TGFBR2 [94, 144, 175]. Uno de los trabajos se basaba en un modelo de OA en conejo [144], otro era con cultivo de condrocitos [175] y sólo uno de ellos se realizó con cartílago humano artrósico, pero únicamente emplearon inmunohistoquímica y observaron la disminución sólo en las muestras muy dañadas [94]. En las muestras moderadamente alteradas la expresión de TGFBR2 fue comparable al cartílago normal o ligeramente elevada [94]. Por lo tanto, ante la falta de evidencia contraria, se puede considerar

que nuestro resultado de falta de cambio en la expresión de TGFBR2 es válido. Además, este resultado se refuerza por la ausencia de cambios en ninguno de los estudios de microarrays de expresión o de proteómica publicados, en los que comparan cartílago artrósico con controles [93, 170, 172, 173].

Algo similar ocurre con ALK5 y ALK1 que sólo han sido estudiados de forma suficiente en modelos de ratón. En la OA humana sus niveles no se han comparado con cartílago control, salvo en los estudios sistemáticos. En éstos, tanto microarrays de expresión como estudios proteómicos, no se han comunicado cambios [93, 170, 172, 173]. Por lo tanto, no hay antecedentes suficientes para sostener el desequilibrio de ALK5 a favor de ALK1 fuera de los modelos en ratones. Nuestros resultados contribuyen a poner en duda esta hipótesis en OA humana.





6 CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado tras la realización del presente proyecto son las siguientes:

1. Para realizar una evaluación precisa en los estudios de expresión mediante qPCR se requiere seleccionar unos genes de referencia adecuados. En cartílago humano artrósico se debe utilizar la combinación de TBP y RPL13A como genes de referencia, pudiendo plantearse la inclusión de B2M.
2. En cartílago humano artrósico hay un aumento de la expresión de las tres isoformas de TGF- β y de su receptor ALK5.
3. A nivel de ARNm se observa una correlación entre los niveles de TGF- β 1 y TGF- β 2, mientras que TGF- β 3, que es la que mayor aumento presenta en su expresión, se regula de forma independiente.
4. En cartílago humano artrósico hay un aumento en la fosforilación de SMAD2 y SMAD3. Estos cambios indican que la ruta canónica de TGF- β está activada, posiblemente como consecuencia del aumento de expresión de las isoformas de TGF- β y de ALK5 y la falta de cambios en la expresión de TGFBR2 y ALK1 y de moléculas supresoras como PPM1A. Estos resultados cuestionan las hipótesis que atribuyen un papel patogénico en la OA humana a defectos en la ruta canónica de TGFbeta.





BIBLIOGRAFÍA



1. Reginster JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology* 2002, 41:3-6.
2. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2009, Suppl 15:S230-S235.
3. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 2010, 26:355-369.
4. Felson DT, Gale DR, Elon GM, Niu J, Hunter DJ, Goggins J, et al. Osteophytes and progression of knee osteoarthritis. *Rheumatology* 2005, 44(1):100-104.
5. Loeser RF, Shakoor N. Aging or OA: which is the problema? *Rheum Dis Clin North Am* 2003, 29:653-673.
6. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62:2241-2256.
7. Anderson AS, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010, 24(1):15-26.
8. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical and therapeutic approach. *Semin Arthritis Rheum* 2009, 39(2):71-80.
9. Stevens AL, Wishnok JS, White FM, Grodzinsky AJ, Tannenbaum SR. Mechanical injury and cytokines cause loss of cartilage integrity and upregulate proteins

- associated with catabolism, immunity, inflammation, and repair. *Mol Cell Proteomics* 2009, 8(7):1475-1489.
10. Felson DT. OA as a disease of mechanics. *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21:10-15.
 11. Grad S, Lee CR, Gorna K, Gogolewski S, Wimmer MA, Alini M. Surface motion upregulates superficial zone protein and hyaluronan production in chondrocyte-seeded three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng* 2005, 11:249-256.
 12. Burr DB. The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis. *J Rheumatol* 2004, Suppl 70:77-80.
 13. Rosner IA, Man ni A, Malemud B, Boja B, Moskovitz RM. Estradiol receptors in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1982, 106:1378-1382.
 14. Ricchette P, Dumontier MF, Tahiri K, Widerak M, Torre A, et al. Oestrogens inhibit interleukin 1beta-mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment. *Ann Rheum Dis* 2007, 66(3):345-50.
 15. Calvo E, Castañeda S, Largo R, Fernandez-Valle F, Rodriguez-Salvanes F, Herrero-Beaumont G.

- Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007, 15:69-77.
16. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage* 2013, 21(1):16-21.
 17. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(2):93-103.
 18. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structure. *Biomaterials* 1992. 13:67-97.
 19. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage structure: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008, 87:77-95.
 20. Maroudas A. Physiochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, editor, ed. *Adult Articular Cartilage*. Kent, UK: Cambridge University Press 1979, 215-290.
 21. Buckwalter JA, Rosenberg LA, Hunziker EB. *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*. New York, NY: Raven Press, 1990.

22. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J of Mol Histology* 2005, 36:207-215.
23. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14(1):13-29.
24. Finnson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A. TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci* 2012, 4:251-268.
25. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43:1916-1926.
26. Dingle JT. Catabolin-a cartilage catabolic factor from synovium. *Clin Orthop Relat Res* 1981, 156:219-231.
27. Pujol JP, Loyau G. Interleukin-1 and osteoarthritis. *Life Sci* 1987, 41(10):1187-1198.
28. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediator or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996, 25(4):254-272.
29. Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, Suppl A:S31-S33.
30. Vuolteenaho K, Moilanen T, Jalonon U, Lahti A, Nieminen R, van Beuningen HM, et al. TGF β inhibits IL-1 induced iNOS expression and NO production in

- immortalized chondrocytes. *Inflamm Res* 2005, 54(10):420-427.
31. Pasternak RD, Hubbs SJ, Caccese RG, Marks RL, Conaty JM, DiPasquale G. Interleukin-1 stimulates the secretion of proteoglycan and collagen-degrading proteases by rabbit articular chondrocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1986, 41(3):351-367.
32. Takahashi N, Rieneck K, van der Kraan PM, van Beuningen HM, Vitters EL, Bendtzen K, et al. Elucidation of IL-1/TGF-beta interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(5):426-438.
33. Bocquet J, Daireaux M, Langris M, Jouis V, Pujol JP, Beliard R, et al. Effect of a interleukin-1 like factor (mononuclear cell factor) on proteoglycan synthesis in cultured human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 134(2):539-549.
34. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin invest* 1994, 94(6):2307-2316.
35. Bhatnagar R, Penfornis H, Mauviel A, Loyau G, Saklatvala J, Pujol JP. Interleukin-1 inhibits the synthesis of collagen by fibroblasts. *Biochem Int* 1986, 13(4):709-720.

36. Hubbard JR, Steinberg JJ, Bednar MS, Sledge CB. Effect of purified human interleukin-1 on cartilage degradation. *J Orthop Res* 1988, 6(2):180-187.
37. O'Byrne EM, Schroder HC, Stefano C, Goldberg RL. Catabolin/interleukin-1 regulation of cartilage and chondrocyte metabolism. *Agents Actions* 1987, 21:341-344.
38. Pujol JP, Galera P, Redini F, Mauviel A, Loyau G. Role of cytokines in osteoarthritis: comparative effects of interleukin-1 and transforming growth factor-beta on cultured rabbits articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl* 1991, 27:76-79.
39. Redini F, Galera P, Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1988, 234:172-176.
40. Redini F, Daireaux M, Mauviel A, Galera P, Loyau G, Pujol JP. Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Biochim Biophys Acta* 1991, 1093:196-206.
41. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* 1989, 260(2):543-548.

42. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999, 40(1):1-11.
43. van der Kraan PM, Glansbeek HL, Vitters EL, van den Berg WB. Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion. *J Rheumatol* 1997, 24(3):543-549.
44. Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992, 35(5):530-540.
45. Wang J, Verdonk P, Elewaut D, Veys EM, Verbruggen G. Homeostasis of the extracellular matrix of normal and osteoarthritic human articular cartilage chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11(11):801-809.
46. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den berg WB. In vivo protection against interleukin-1 induced articular cartilage damage by transforming growth factor-beta 1: age-related differences. *Ann Rheum Dis* 1994, 53(9):593-600.
47. Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The sinovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the celular infiltrate present in

- inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1988, 47(4):300-307.
48. Benito MJ, Veale DJ, Fitzgerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64(9):1263-1267.
49. Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Yousseff PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997, 24(2):365-371.
50. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis – results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(5):361-367.
51. Gelse K, Soder S, Eger W, Diemtar T, Aigner T. Osteophyte development-molecular characterization of differentiation stages. *Osteoarthritis Cartilage* 2003, 11(2):141-148.
52. Pottenger LA, Phillips FM, Draganich LF. The effect of marginal osteophytes on reduction of varus-valgus instability in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 1990, 33(6):853-858.

53. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15(1):1-11.
54. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physiopathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(7):1161-1165.
55. Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., & Sporn M. B. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258:7155-7160.
56. Sporn MB. The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006, 17:3-7.
57. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J. Cell Biol* 1992, 119:1017-1021
58. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1032:79-87.
59. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab* 1998, 24:111-119.

60. Massague J, Cheifetz S, Ignatz RA, Boyd FT. Multiple type beta transforming growth factors and their receptors. *J.Cell Physiol* 1987, Suppl 5:43-47.
61. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988, 242:1528-1534.
62. Massague J. The transforming growth factor beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990, 6:597-641.
63. Nakajima M, Kizawa H, Saitoh M, Miuzono K, Ikegawa S, et al. Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem* 2007, 282:32185-32192.
64. Wu J, Liu W, Bemis A, Wang E, Qiu Y, Morris EA, Flannery CR, Yang Z. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56(11):3675-3874.
65. Bottinger EP, Letterio JJ, Roberts AB. Biology of TGF- β in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int* 1997, 51(5):1355-1360.
66. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF- β isoforms in embryogenesis suggests specific roles

- in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 1992, 32(2):91-98.
67. Lawrence DA. Latent TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 2001, 219:163-170.
68. Todorovic V, Jurokovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2005, 37(1):38-41.
69. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF- β activation. *Journal of Cell Science* 2003, 116(2):217-224.
70. Ramirez F, Rifkin DB. Extracellular microfibrils: contextual platforms for TGF- β and BMP signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2009, 21(5):612-622.
71. Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor- β activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008, 40:1068-1078.
72. Wipff PJ, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1. An intimate relationship. *Eur J Cell Biol* 2008.
73. Roberts AB. TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* 1999, 1(15):1265-1273.

74. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002, 118(2):211-215.
75. Lin X, Duan X, Liang Y, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, et al. PPM1A functions as a Smad Phosphatase to terminate TGF β signaling. *Cell* 2006, 125:915-928.
76. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. Activin receptor-like kinase (ALK) 1 is an antagonistic mediator of lateral TGF β /ALK5 signaling. *Mol Cell* 2003, 12(4):817-828.
77. Wu X, Ma J, Han JD, Wang N, Chen YG. Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc Res* 2006, 71:12-19.
78. Seki T, Hong KH, Oh SP. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 2006, 86:116-129.
79. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009, 29:128-139.

80. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003, 425(6958):577-584
81. Javelaud D, Mauviel A. Crosstalks mechanisms between the mitogen-activated protein kinases pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005, 24(37):5742-5750.
82. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006, 97(1):33-44.
83. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(1):29-41.
84. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15:597-604.
85. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(12):1539-1545.
86. Grimaud E, Heymann D, Redini F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential

- therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. Cytokine Growth Factor Rev 2002, 13:241-257.
87. Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage 2007, 15:1367-1377.
 88. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB, et al. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. J Immunol 2002, 169:507-514.
 89. Kou I, Nakajima M, Ikegawa S. Binding characteristics of the osteoarthritis-associated protein asporin. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2010 28:395-402.
 90. Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, Saito M, Honjyo K, Hiraoka N, Kishida T, Mazda O, Imanishi J, Kubo T. Asporin and transforming growth factor-beta gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis. J Orthop Sci 2009, 14(6):738-747.
 91. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y,

- Ikegawa S. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 2005, 37(2):138-144.
92. Nakajima M, Kizawa H, Saitoh M, Miuzono K, Ikegawa S, et al. Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem* 2007, 282:32185-32192.
93. Wu J, Liu W, Bemis A, Wang E, Qiu Y, Morris EA, Flannery CR, Yang Z. Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007, 56(11):3675-3874.
94. Verdier MP, Seite S, Guntzer K, Pujol JP, Boumediene K. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int* 2005, 25(2):118-124.
95. Pombo-Suarez M, Castaño-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis* 2009, (68): 568-571.
96. Aref-Eshghi E, Liu M, Harper P, Doré J, Martin G, Furey A, Green R, Rahman P, Zhai G. Overexpression of

- MMP13 in human osteoarthritic cartilage is associated with the SMAD-independent TGF- β signaling pathway. *Arthritis Res Ther* 2015, 17:264.
97. Tardif G, Pelletier JP, Fahmi H, Hum D, Zhang Y, Kapoor M, Martel Pelletier J. NFAT3 and TGF-beta/SMAD3 regulate the expression of miR-140 in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2013, 15(6):R197.
98. Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Waters J, Hajihosseini MK, Clark I, Dalmay T. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* 2006, 580(17):4214-4217.
99. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier J, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* 1997, 40(9):1653-1661.
100. Leivonen SK, Ala-Aho R, Koli K, Grenman R, Peltonen J, Kahari VM. Activation of Smad signaling enhances collagenase-3 (MMP-13) expression and invasion of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogen* 2006, 25(18):2588-2600.

101. Selvamurugan N, Fung Z, Partridge NC. Transcriptional activation of collagenase-3 by transforming growth factor-beta1 is via MAPK and Smad pathways in human breast cancer cells. *FEBS Lett*, 2002, 532:31-35.
102. Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, Kahari VM. Smad3 mediates transforming growth factor-beta induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase 3) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002, 277(48):46338-46346.
103. Selvamurugan N, Kwok S, Alliston T, Reiss M, Partridge NC. Transforming growth factor-beta1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2. *J Biol Chem* 2004, 279(18):19327-19334.
104. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. Transforming growth factor-beta1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 1994, 71(2):279-290.
105. van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular

- transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8(1):25-33.
106. Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, Richards CD, van den Berg WB. Overexpression of active TGF-beta1 in the murine knee joint: evidence for sinovial layer dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9(2):128-136.
107. Blaney Davidson EN, Remst DF, Vitters EL, van Beuningen HM, Blom AB, Goumans MJ, van den Berg WB, van der Kraan PM. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. *J Immunol* 2009, 182(12):7937-7945.
108. Finnson KW, Parker WL, ten Dijke P, Thorikay M, Philip A. ALK1 opposes ALK5/SMAD3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Min Res* 2008, 23:896-906.
109. Zhai G, Doré J, Rahman P. TGF- β signal transduction pathways and osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2015, 35:1283-1292.
110. Mallein-Gerin F, Gouttenoire J. RNA extraction from cartilage. *Methods Mol Med* 2004, 100:101-104.

111. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 2002, 1:57-65.
112. Wang J, Hu L, Hamilton SR, Coombes KR, Zhang W. RNA amplification strategies for cDNA microarray experiments. *Biotechniques* 2003, 34:394-400.
113. Subkhankulova T, Livesey FJ. Comparative evaluation of linear and exponential amplification techniques for expression profiling at the single-cell level. *Genome Biol* 2006, 7:R18.
114. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54:3533-3544.
115. Eid K, Thornhill TS, Glowacki J. Chondrocyte gene expression in osteoarthritis: correlation with disease severity. *J Orthop Res* 2006, 24:1062-1068.
116. Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, et al. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2006, 54:808-817.

117. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004, 15:155-166.
118. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005, 39:75-85.
119. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005, 6:279-284.
120. Hansen MC, Nielsen AK, Molin S, Hammer K, Kilstrup M. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *J Bacteriol* 2001, 183: 4747-4751.
121. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000, 29:332-337.
122. Lee PD, Sladek R, Greenwood CM, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res* 2002, 12:292-297.
123. Dheda K, Huggett J, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for

- normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004, 37:112-119.
124. Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. Beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA results.
125. Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, Nitsche A, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med* 2005, 83:1014-1024.
126. Laidlaw AM, Copeland B, Ross CM, Hardingham JE. Extent of overexpression of hepatocyte growth factor receptor in colorectal tumours is dependent on the choice of normaliser. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 341:1017-1021.
127. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002, 3:R34.
128. Dheda K, Hugguett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse

- transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005, 344:141-143.
129. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004, 64:5245-5250.
 130. Muehleman C, Bareither D, Huch K, Cole AA, Kuettner KE. Prevalence of degenerative morphological changes in the joints of the lower extremity. *Osteoarthritis Cartilage* 1997, 5:23-37.
 131. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologic programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz S, Misener S, Totowa NJ, Humana Press 2000, 365-382.
 132. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *NeurosciLett* 2003, 339:62-66.
 133. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol* 2008, 9:17.

134. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007, 8:R19.
135. Mozes MM, Hodics T, Kopp JB. Isoform specificity of commercially-available anti-TGF-beta antibodies. *J Immunol Methods* 1999, 225:87-93.
136. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation (1994) *Methods Mol Biol* 32:9-15.
137. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem* 2002, 303:95-98.
138. Al-Shanti N, Saini A, Stewart CE. Two-Step versus One-Step RNA-to-CT™ 2-Step and One-Step RNA-to-CT™ 1-Step: Validity, Sensitivity, and Efficiency. *J Biomol Tech* 2009, 20(3): 172-179.
139. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and simple integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004, 26:509-515.
140. Wang WZ, Guo X, Duan C, Ma WJ, Zhang YG, Xu P, Gao ZQ, Wang ZF, Yan H, Zhang YF, Yu YX, Chen JC, Lammi MJ. Comparative analysis of gene expression

- profiles between the normal human cartilage and the one with endemic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17:83-90.
141. Grainger DJ, Percival J, Chiano M, Spector TD. The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999, 225:87-93.
142. Georgescu C, Seck T, Diel I, Minne H, Duncea I, Pfeilschifter J, et al. Bone matrix insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and transforming growth factor (TGF)-beta1 levels in men and postmenopausal women with osteoporosis: lack of association with circulating growth factors and bone mineral density. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2004, 108:281-286.
143. Blaney-Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan P, van der Berg W. Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 2006, 65:1414-1421.
144. Boumediene K, Conrozier T, Mathieu P, Richard M, Marcelli C, Vignon E, et al. Decrease of cartilage transforming growth factor-beta receptor II expression in the rabbit experimental osteoarthritis—potential role in cartilage breakdown. *Osteoarthritis Cartilage* 1998, 6:146-149.

145. Roberts AB, Sporn MB. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 1992, 32:91-98.
146. Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997, 124: 2659-2670.
147. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998, 30: 293-298.
148. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralization of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995, 108:985-1002.
149. Balzar S, Chu HW, Silkoff P, Cundall M, Trudeau JB, Strand M, Wenzel S. Increased TGF beta 2 in severe asthma with eosinophilia. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115 (1):110-117.
150. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF β isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2003, 64:844-856.
151. Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenback F. TGF- β isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting

- separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol* 2000, 190:579-588.
152. Matyas JR, Ehlers PF, Huang D, Adams ME. The early molecular natural history of experimental osteoarthritis. I. Progressive discoordinate expression of aggrecan and type II procollagen messenger RNA in the articular cartilage of adult animals. *Arthritis Rheum* 1999, 42:993-1002.
153. Matyas JR, Huang D, Chung M, Adams ME. Regional quantification of cartilage type II collagen and aggrecan messenger RNA in joints with early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46:1536-1546.
154. Brew CJ, Clegg PD, Boot-Handford RP, Andrew JG, Hardingham T. Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Ann Rheum Dis* 2010, 69:234-240.
155. Van den Bosch MH, Blom AB, van Lent PL, van Beuningen HM, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. Canonical Wnt signaling skews TGF- β signaling in chondrocytes towards signaling via ALK1 and Smad 1/5/8. *Cell Signal* 2014, 26 (5):951-958.
156. Kim YG, Sohn DH, Zhao X, Sokolove J, Lindstrom TM, Yoo B, Lee CK, Reville JD, Taurog JD, Robinson WH. Role of PPM1A and anti-PPM1A autoantibodies in

- ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* 2014, 66 (10):2793-2803.
157. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR Green I real-time RT-PCR. *Annal Biochem* 2002, 303:95-98.
158. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003, 98(2):257-265.
159. Jobling AI, Nguyen M, Gentle A, McBrien NA. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression. *J Biol Chem* 2004, 279(18):18121-18126.
160. Foldager CB, Munir S, Ulrik-Vinther M, Søballe K, Bünger C, Lind M. Validation of suitable housekeeping genes for hypoxia-cultured human chondrocytes. *BMC Molecular Biology* 2009, 10:94.
161. Studer D, Lischer S, Jochum W, Ehrbar M, Zenobi-Wong M, Maniura-Weber K. Ribosomal Protein L13a as a reference gene for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells during expansion, adipogenic, chondro- and osteogenesis. *Tissue Engineering Part C: Methods* 2012, 18(19):761-771.
162. Zhou ZJ, Zhang JF, Xia P, Wang JY, Chen S, Fang XQ, Fan SW. Selection of suitable reference genes for

- normalization of quantitative real-time polymerase chain reaction in human cartilage endplate of the lumbar spine. PLoS ONE 2014, 9(2): e88892. doi:10.1371/journal.pone.0088892.
163. Cheng T, Maddox NC, Wong AW, Rahnama R, Kuo A C. Comparison of gene expression patterns in articular cartilage and dedifferentiated articular chondrocytes. J Orthop Res 2012, 30:234–245.
164. Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, Upton Z, Malda J, Leavesley DI. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. Cell and Tis Res 2012, 347(3):649-663.
165. Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells. Arthritis & Rheumatism 2009, 60: 1416–1426.
166. Yin W, Park JI, Loeser RF. Oxidative Stress Inhibits Insulin-like Growth Factor-I Induction of Chondrocyte Proteoglycan Synthesis through Differential Regulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK Signaling Pathways. J of Biol Chem 2009, 284:31972-31981.
167. Karaliotas, G.I., Mavridis, K., Scorilas, A., & Babis, G.C. (2015). Quantitative analysis of the mRNA expression

- levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression. *Molecular Medicine Reports*, 12, 4514-4521.
168. Nagase H, Nagasawa Y, Tachida Y, Sakakibara S, Okutsu J, Suematsu N, Arita S, Shimada K. Deiodinase 2 upregulation demonstrated in osteoarthritis patients cartilage causes cartilage destruction in tissue-specific transgenic rats. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2013, 21:514-523.
169. Xiao J, Li T, Wu Z, Shi Z, Chen J, Lam SK, Zhao Z, Yang L, Qiu G. REST corepressor (CoRESRT) repression induces phenotypic gene regulation in advanced osteoarthritic chondrocytes. *J of Orthop Res* 2010, 28(12):1569-1575.
170. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sittinger M, Ringe J. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010, 18(4):581-592.
171. Zheng G, Wen C, Jia X, Crane JL, Mears JC, Askin FB, Frassica FJ, Chang W, et al. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells or subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature Medicine* 2013, 19:704-712.

172. Xu Y, Barter MJ, Swan DC, Rankin KS, Rowan AD, Santibanez-Koref M, Loughlin J, Young DA. Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritis hip cartilage: commonality and discord between hip and knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012, 20(9):1029-1038.
173. Fu M, Huang G, Zhang Z, Liu J, Zhang Z, Huang Z, Yu B, Meng F. Expression profiling of long noncoding RNAs in cartilage from knee osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015, 23(3):423-432.
174. Schmierer B, Hill CS. TGF β -Smad signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8:970-982.
175. Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittering M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(5):R133.



ANEXO



Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Lack of association of a variable number of aspartic acid residues in the asporin gene with osteoarthritis susceptibility: case-control studies in Spanish Caucasians. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(3):R55.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1526645/>



Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Further evidence of the role of frizzled-related protein gene polymorphisms in osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2007, 66(8):1052-1055

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1954696/>



Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM, Pombo-Suarez M, Snelling S, Gomez-Reino JJ, Chapman K, Gonzalez A, Loughlin J. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. Hum Mol Genet 2007, 16(18):2226-2232.

<http://hmg.oxfordjournals.org/content/16/18/2226.long>



Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression in human osteoarthritic articular cartilage. BMC Mol Biol 2008, 9:17.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248200/>



Rodriguez-Lopez J, Mustafa Z, Pombo-Suarez M, Malizos KN, Rego I, Blanco FJ, Tsezou A, Loughlin J, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Genetic Variation Including Nonsynonymous Polymorphisms of a Major Aggrecanase, ADAMTS-5, in Susceptibility to Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(2):435-441.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240210>



Pombo-Suarez M, Castaño-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Differential upregulation of the three transforming growth factor beta isoforms in human osteoarthritic cartilage. Ann Rheum Dis 2009, (68): 568-571.

<http://ard.bmj.com/content/68/4/568.long>



Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Loughlin J, Tsezou A, Blanco FJ, Meulenbelt I, Slagboom PE, Valdes AM, Spector TD, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Association of a nsSNP in ADAMTS14 to some osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(3): 321-327.

[http://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(08\)00247-1/fulltext](http://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(08)00247-1/fulltext)



Egli RJ, Southam L, Wilkins JM, Lorenzen I, Pombo-Suarez M, Gonzalez A, Carr A, Chapman K, Loughlin J. Functional Analysis of the Osteoarthritis Susceptibility–Associated *GDF5* Regulatory Polymorphism. *Arthritis Rheum* 2009, 60(7):2055-2064.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565498>



Rodriguez Fontenla C, Lopez-Golan Y, Calaza M, Pombo-Suarez M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Genetic Risk Load and Age at Symptom Onset of Knee Osteoarthritis. J Orthop Res 2012, 30(6):905-909.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.22018/epdf>

